

基于 ITS 条形码序列的刺桐姬小蜂分子鉴定*

黄蓬英^{1**} 林玲玲¹ 李雯琳² 洪钦阳² 张玲华² 廖富荣¹

(1. 厦门出入境检验检疫局 厦门 361026; 2. 福建农林大学植物保护学院 福州 350003)

摘要 【目的】刺桐姬小蜂 *Quadrastichus erythrinae* Kim 体型小, 传统的形态学鉴定方法难以快速准确识别。【方法】本研究测定了刺桐姬小蜂的 rDNA ITS1 和 ITS2 序列, 根据 18S rDNA 部分序列, 利用 MEGA 的最大相似法 (Maximum Likelihood) 构建系统发育树。根据刺桐姬小蜂 ITS1 和 ITS2 序列设计了特异引物, 应用特异引物对单只刺桐姬小蜂进行 PCR 扩增, 可稳定地扩增出明显的目的 DNA 条带。【结果】研究表明, 基于 ITS 基因的 DNA 条形码技术可以用于刺桐姬小蜂的快速准确鉴定。【结论】因此, 采用 ITS1 和 ITS2 区的特异性引物可对刺桐姬小蜂进行快速分子鉴定。
关键词 刺桐姬小蜂, ITS 基因, DNA 条形码, 特异引物, 分子鉴定

Application of DNA barcoding technology to the identification of *Quadrastichus erythrinae* Kim (Hymenoptera: Eulophidae)

HUANG Peng-Ying^{1**} LIN Ling-Ling¹ LI Wen-Lin² HONG Qin-Yang²
ZHANG Ling-Hua² LIAO Fu-Rong¹

(1. Xiamen Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Xiamen 361012, China;

2. College of Plant Protection, Fujian Agricultural and Forestry University, Fuzhou 350003, China)

Abstract [Objectives] *Quadrastichus erythrinae* Kim (Hymenoptera: Eulophidae) is too small to be identified quickly and accurately by traditional morphological methods. [Methods] The complete sequences of the rDNA ITS1 and ITS2 genes were determined for *Q. erythrinae*. A phylogenetic tree was established on the basis of variation in 18SrDNA part sequences using MEGA Maximum Likelihood. Species-specific primers of *Q. erythrinae* were designed based on the rDNA ITS1 and ITS2 sequences. The results of PCR amplification of rDNA ITS1 and ITS2 indicate that these species-specific primers could reliably identify this species. [Results] The results suggest that the species-specific primers developed produce clear, unique and reproducible target DNA bands from individual adult wasps. Molecular identification of *Q. erythrinae* using species-specific primers from the rDNA ITS1 and ITS2 region is therefore feasible. [Conclusion] This study identified a possible avenue for the molecular identification of *Q. erythrinae*.

Key words *Quadrastichus erythrinae*, ITS gene, DNA barcoding, diagnostic primers, molecular identification

刺桐姬小蜂 *Quadrastichus erythrinae* Kim 隶属膜翅目 Hymenoptera, 小蜂总科 Chalcidoidea, 姬小蜂科 Eulophidae, 啮小蜂亚科 Tetrastichinae, 胯姬小蜂属 *Quadrastichus*, 是一种新入侵害虫, 专一危害刺桐属植物。2003 年在中国台湾首次

被发现, 2004 年 Kim 等将其描述为新种。我国大陆于 2004 年在深圳市首次发现该虫, 2005 年准确确定其种类, 2007 年将刺桐姬小蜂列入中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录。目前国外主要分布于毛里求斯、留尼旺、新加坡、

* 资助项目: “十二五”国家科技支撑计划课题 (2012BAK11B03); 厦门市科技计划项目 (3502Z20112016)

**通讯作者, E-mail: hpy7766@163.com

收稿日期: 2013-10-21, 接受日期: 2013-12-09

美国(夏威夷、佛罗里达州)、印度、泰国、菲律宾、日本(关岛、冲绳)等地;国内主要分布在广东(深圳、广州)、广西(南宁)、海南(除东方、白沙外)、福建(厦门、漳州、泉州)、中国台湾、中国香港等地。刺桐姬小蜂个体微小,体长约 1.4~1.6 mm,生活周期短,繁殖能力强,1 个世代大约 1 个月左右,1 年可发生多个世代,世代重叠严重。该虫为害时先将卵产于新叶、嫩芽、嫩枝、叶柄等植株幼嫩组织的表皮下,幼虫孵出后取食叶肉组织,受害部位逐渐形成肿大虫瘿,造成受害组织卷曲、畸形,受害严重的植株会大量落叶,生长迟缓,甚至死亡(黄蓬英等, 2005)。Li 等(2006)对刺桐姬小蜂全球适生区预测表明刺桐姬小蜂在亚洲、非洲、大洋洲、南美洲及北美洲南部大部分地区都能存活,并能在全球热带、亚热带地区扩散,因此要严防刺桐姬小蜂随寄主植物进一步扩散蔓延。

DNA 条形码技术是一门利用 DNA 小片段对物种加以辨识及鉴定的分子生物学技术(杨耀华, 2013)。该技术已成为生物物种鉴定的新方向,受到世界 40 多个国家 130 多个组织的传统生物分类学家、分子生物学家和生物信息学家等多学科专家的关注。目前,利用 DNA 条形码技术进行分子鉴定已广泛运用于植物和动物上。曾旭等(2011)以核基因 ITS2 片段作为 DNA 条形码,对中药材威灵仙基源植物及其易混品间的种内、种间序列差异进行分析比较。石林春等(2011)利用 ITS2 条形码鉴定了京大戟及其易混品。乔玮娜等(2012)将 DNA 条形码技术应用于蓟马分类研究,验证了 DNA 条形码在蓟马快速准确鉴别中的有效性。Dai 等(2012)基于 CO I 基因以及 ITS1 和 ITS2 基因对松毛虫近缘种进行了分类鉴定,并构建了相关类群的系统演化关系。

由于刺桐姬小蜂个体微小,与近缘种之间形态相似,对于非专业从事小蜂分类的人员而言鉴定困难,并且传统的形态学方法对于肢体残缺的个体难以鉴定。近年来,刺桐属植物作为行道树种植在南方十分普遍,刺桐属植物调运较频繁,对疫情控制造成严重威胁。因此,本实验采用 DNA 条形码技术,以刺桐姬小蜂 ITS 基因为靶

标,设计特异引物,进行该虫快速鉴定识别技术研究,旨在为有效阻止刺桐姬小蜂害虫的进一步传播扩散,保护农林业生产安全提供技术保障。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

本实验中用于 DNA 条形码技术鉴定的刺桐姬小蜂于 2008 年采自福建厦门的象牙红和 2009 年采自海南三亚的鸡冠刺桐,米尔顿姬小蜂 *Anselmella miltoni* Girault 从 2007 年到至今从进境台湾莲雾中截获,桉树枝瘿姬小蜂 *Leptocybe invasa* Fisher & LaSalle 于 2009 年采自海南儋州的尾叶桉,所有标本用 100%酒精浸泡,保存于 -70℃ 冰箱中备用。

1.2 总 DNA 的提取

DNA 的提取参照潘力等(2010)报道的方法并稍加改进。将刺桐姬小蜂单只蜂放入高压灭菌过的离心管,捣碎,加入 100 μ L 10 $\times$ TE buffer 浸泡 1 h。将离心管置于振荡器上,使匀浆振荡混合,盖紧离心管盖,并用封口膜密封。置于微波炉中,用 700 W 加热 2 min,取出离心管立即转入冰浴 2 min,上述步骤重复 2~3 次。12 000 r/min,离心 1 min,吸取上清液总 DNA,将提取好的总 DNA 放于 -20℃ 保存,以便使用。

1.3 ITS 的 PCR 扩增

本研究中所用的扩增 ITS1 序列引物对 18sF1/5p8sB1d 参照 Sha 等(2007)设计,扩增 ITS2 序列引物对 ITS2F/R 参照 Carpenter 和 Wheeler(1999),由上海生物工程技术服务有限公司合成。25 μ L 反应体系如下:10 $\times$ Dream Taq™ Buffer (includes 20 mmol/L MgCl₂) 2.5 μ L, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 2 μ L, 上游引物和下游引物各 1.5 μ L (10 μ mol/L), Dream Taq™ DNA Polymerase (5 U/ μ L) 0.2 μ L, 模板 DNA 4 μ L, 加灭菌双蒸水至终体积。反应参数如下:95℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 45 s, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 运行 35 个循环;最后 72℃ 延伸 7 min。

1.4 克隆测序及序列分析

PCR 产物回收纯化后委托上海生工生物工程公司完成克隆及序列测定。

将测序所得 DNA 序列通过 NCBI 作 BLAST 相似性检索, 经人工核对后确认所得的序列片段, 用 DNAMAN 和 DNACLU 软件进行序列的剪裁与分析。

用于比较分析的膜翅目昆虫其他种类序列见表 1, 采用 MEGA Construct/Test Maximum Likelihood 方法绘制分子系统发育树。

1.5 特异性引物设计与合成

根据刺桐姬小蜂 rDNA 的 ITS1 和 ITS2 的测序和比对结果, 应用 Primer Premier 5 软件比对, 为刺桐姬小蜂在 rDNA ITS1 和 ITS2 区各设计了一条特异性引物 Q.er-ITS1 和 Q.er-ITS2 (表 2)。引物由上海生工生物工程公司合成。

1.6 刺桐姬小蜂特异性 PCR 检测

特异引物序列见表 2, 提取总 DNA, 再进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳检测结果。

表 1 用于比较分析的膜翅目昆虫种类序列
Table 1 Hymenoptera species sequences used

种名 Species	科名 Family	GenBank 登录号 GenBank accession no.
<i>Muscidifurax raptorellus</i>	金小蜂科 Pteromalidae	DQ412040
<i>Muscidifurax zaraptor</i> MzN27I	金小蜂科 Pteromalidae	DQ412038
<i>Muscidifurax zaraptor</i> isolate MzNcI	金小蜂科 Pteromalidae	DQ412039
<i>Muscidifurax raptor</i> isolate MrRaI	金小蜂科 Pteromalidae	DQ412037
<i>Muscidifurax uniraptor</i> isolate MuNYI	金小蜂科 Pteromalidae	DQ412041
<i>Promuscidea unfasciiventris</i>	蚜小蜂科 Aphelinidae	AB66799
<i>Anselmella miltoni</i> isolate TW	姬小蜂 Eulophidae	JF970194
<i>Trichogramma</i> sp.	赤眼蜂科 Trichogrammatidae	GQ228084
<i>Aenasius bambawalei</i>	跳小蜂科 Encyrtidae	AB667993
<i>Diadegma fenestrata</i>	姬蜂科 Ichneumonidae	JQ801449
<i>Diadegma fenestrata</i>	姬蜂科 Ichneumonidae	DQ408502
<i>Dasymutilla gloriosa</i>	蚁科 Formicidae	DQ408505
<i>Dasymutilla nocturna</i>	蚁科 Formicidae	DQ408504

表 2 特异引物序列与目标扩增产物大小及 TM 值
Table 2 Species-specific primers sequences, the target product size and TM

特异性引物 Species-specific primers	引物序列 (5'-3') Primer sequences	产物大小 (bp) Product size	温度 Temperature (°C)
Q.er-ITS1F	CCT CTC TgC TTC TCT CgC CAT	465	58
Q.er-ITS1R	CAA CCg AgA gAA CgA gAg TCg		
Q.er-ITS2F	CgT TCg AgA TTT CAT TCg C	293	52
Q.er-ITS2R	CAG TCg ATT TCg TCA AgC g		

1.7 刺桐姬小蜂特异引物灵敏度检测

为鉴定所设计的引物及 PCR 反应所能测定的单只刺桐姬小蜂 DNA 浓度, 采用梯度稀释法, 按 10 倍梯度逐级稀释, 各取 2 μ L 进行 PCR 扩增, PCR 扩增同 1.3。即用 $1 \times 10^0 \sim 1 \times 10^{-5}$ 不同浓度的总 DNA 模板进行扩增, 琼脂糖凝胶电泳检测结果。

2 结果与分析

2.1 刺桐姬小蜂 ITS 的 PCR 扩增

利用 ITS 通用引物对刺桐姬小蜂进行 PCR 扩增, 结果表明, 引物 18sF1/5p8sB1d 扩增到约 1 150 bp 的条带, 引物 ITS2F/ITS2R 扩增到约 550 bp 的条带 (图 1)。

2.2 刺桐姬小蜂 ITS 的序列分析

测序结果表明, 分别获得了 1 141 bp 和 561 bp 的序列。经拼接后, 共获得了 1 658 bp 的刺桐姬小蜂的 ITS 区序列。序列分析表明, 该序列含有 175 bp 的部分 18S rDNA, 865 bp 的完整 ITS1, 146 bp 5.8S rDNA, 427 bp 的完整 ITS2, 45 bp 的部分 28S rDNA。碱基组成分析表明, ITS1 区 A+T 含量较低, 为 45.55%, 5.8S 区 A+T 含量较低, 为 44.52%, ITS2 区 A+T 含量较低, 为 44.26%。GenBank 登录号为 KF153116。

刺桐姬小蜂与膜翅目其他种类的同源性 (表 3) 表明, 18S rDNA 同源性在 94%~100% 之间, ITS1 同源性在 25.2%~38.6% 之间, 5.8 S rDNA 的同源性在 50%~100% 之间。说明 18S rDNA、

5.8S rDNA 序列相对保守, ITS1 种间差异较大。

根据 18 S rDNA 部分序列, 利用 MEGA Maximum Likelihood 计算方法构建系统发育树 (图 2)。小蜂总科的各个种类聚合成一大支, 刺桐姬小蜂与金小蜂科的 *Muscidifurax zaraptor*、

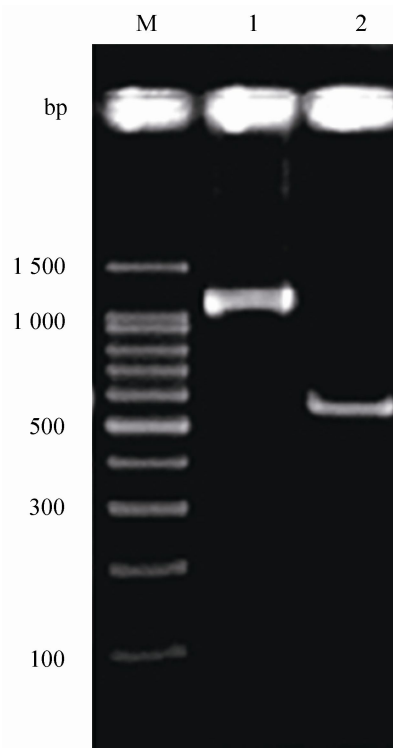


图 1 刺桐姬小蜂 ITS 的 PCR 扩增结果
Fig. 1 PCR amplification of rDNA ITS1 and ITS2 genes in *Quadrastichus erythrinae*

M: 100 bp 标准分子量 100 bp DNA marker; 1: 引物对 18sF1/5p8sB1d 扩增获得的条带 PCR amplification with 18sF1/5p8sB1d primer; 2: 引物对 ITS2F/ITS2R 扩增获得的条带 PCR amplification with ITS2F/ITS2R primer.

表 3 刺桐姬小蜂与膜翅目其他种类的同源性比较
Table 3 Comparability homology of *Quadrastichus erythrinae* and other species of Hymenoptera

GenBank 登录号 GenBank accession no.	18S rDNA	ITS1	5.8S rDNA
DQ412040	100%	37.5%	/
DQ412038	100%	38.1%	/
DQ412039	100%	38.6%	/
AB667991	97.4%	25.2%	/
JF970194	98.1%	28.6%	100%
GQ228084	98.7%	28.9%	99%
DQ412037	100%	38.6%	/
DQ412041	98.7%	37.6%	/
AB667993	97.4%	27.5%	/
JQ801449	94.0%	30.7%	100%
DQ408505	97.1%	29.9%	50%
DQ408504	97.1%	29.8%	50%
DQ408502	97.1%	29.6%	50%

“/” 表示没有相应的数据。“/” indicated no data.

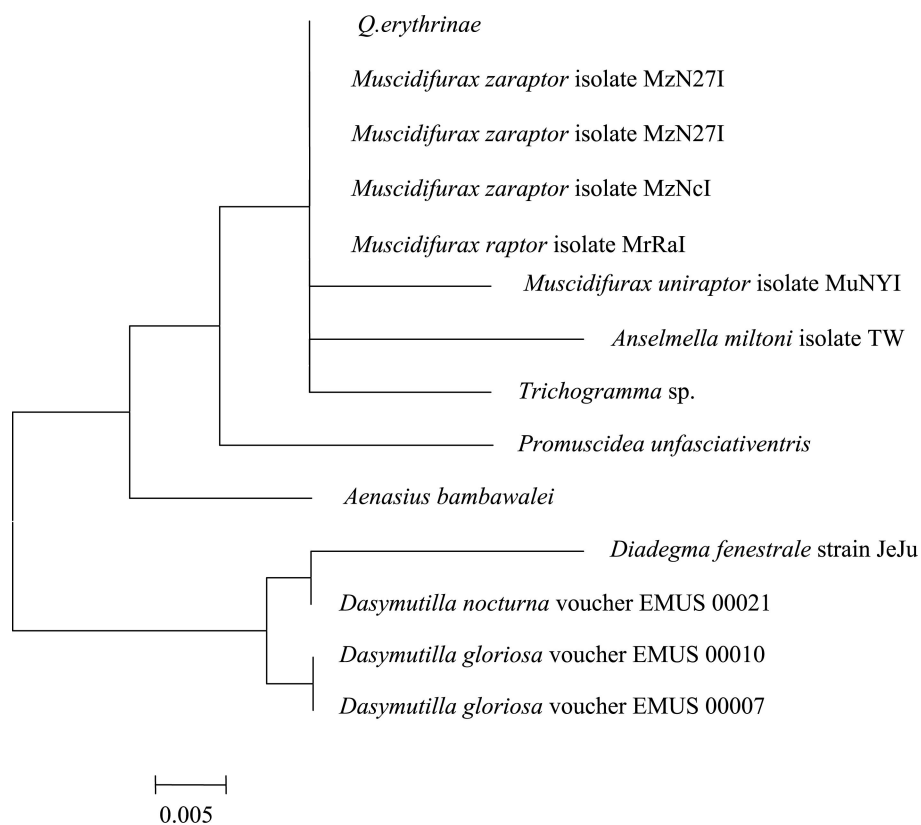


图 2 基于 18S rDNA 部分序列构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree inferred from 18S rDNA part sequences using MEGA Construct/Test Maximum Likelihood

Muscidifurax raptor、*Muscidifurax uniraptor*、姬小蜂科的米尔顿姬小蜂和一种赤眼蜂 *Trichogramma* sp. 聚合在一起, 接着再与蚜小蜂科的 *Promuscidea unfasciativentris* 聚合在一起, 最后再与跳小蜂科的 *Aenasius bambawalei* 聚合成一大支。姬蜂科的 *Diadegma fenestrata* 与蚁科的 *Dasymutilla nocturna* 聚合在一起后再与蚁科的 *Dasymutilla gloriosa* 聚合成一支, 再与小蜂总科各个科聚合成一大支。刺桐姬小蜂与蚁科的 *Dasymutilla gloriosa* 亲缘关系最远。

2.2 PCR 扩增鉴定刺桐姬小蜂

根据刺桐姬小蜂 ITS1 和 ITS2 序列与其他小蜂存在种间差异, 采用设计特异引物的方法同时鉴定采自福建厦门和海南三亚的刺桐姬小蜂。以桉树枝瘿姬小蜂、米尔顿姬小蜂为对照样品, 特异引物 PCR 扩增结果见图 3。在 ITS1 区, 均可从采自福建厦门和海南三亚的刺桐姬小蜂样品扩增到大小为 465 bp PCR 产物, 在 ITS2 区, 均可从采自福建厦门和海南三亚的刺

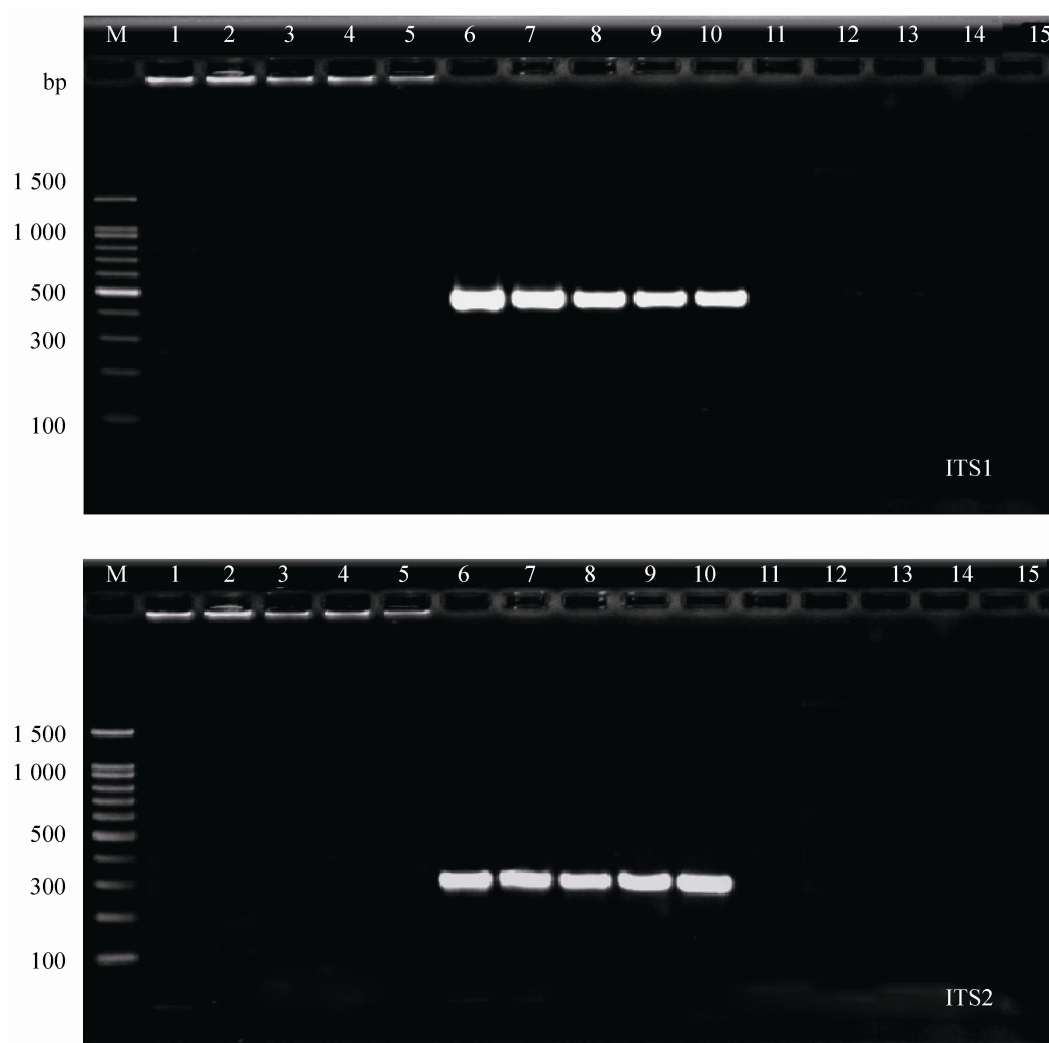


图 3 利用 rDNA ITS1 和 ITS2 区特异性引物对米尔顿姬小蜂、刺桐姬小蜂、桉树枝瘿姬小蜂 PCR 扩增产物电泳图

Fig.3 PCR amplification by using rDNA ITS1 and ITS2 species-specific primers of *Anselmella miltoni*, *Leptocybe invasa*, *Quadrastichus erythrinae*

M: 100 bp 标准分子量 100 bp DNA marker; 1-5: 米尔顿姬小蜂 *Anselmella miltoni*; 6-10: 刺桐姬小蜂 *Quadrastichus erythrinae*, 其中 6-8 采自福建厦门, 9-10 采自海南三亚; 11-15: 桉树枝瘿姬小蜂 *Leptocybe invasa*.

桐姬小蜂样品扩增到大小为 293 bp PCR 产物, 对照样品均无扩增产物。ITS1 和 ITS2 的特异引物扩增效果均理想。因此, 本研究设计的刺桐姬小蜂 ITS1 和 ITS2 特异引物可以对刺桐姬小蜂进行快速的分子鉴定。

2.3 刺桐姬小蜂特异引物灵敏度检验

单只刺桐姬小蜂总 DNA 在 ITS1 区, $10^0 \sim 10^{-4}$ 稀释度的模板扩增均能观察到目的条带, 亮度逐渐减弱, 10^{-4} 稀释度的模板扩增的目的条带比较模糊, 其他稀释度未扩增出目的条带, 在 ITS2 区, $10^0 \sim 10^{-2}$ 稀释度的模板均能观察到目的条带, 10^{-2} 稀释度的模板扩增的目的条带比较模糊, 其他稀释度均未扩增出目的条带 (图 4)。

3 讨论

DNA 鉴定是否有效, 取决于两点, 一是同一 DNA 条形码两物种间不能存在共享序列, 二是种间差异要远大于种内差异。本研究测定了刺桐姬小蜂 rDNA ITS1 和 ITS2 的全序列, ITS1 和 ITS2 序列显示出一定的 CG 偏好性。所得 18S

rDNA 序列与小蜂总科的金小蜂科、赤眼蜂科、跳小蜂、蚜小蜂科种类同源性高, 说明 18S rDNA 序列相对保守。ITS 序列长度适中, 易于扩增, 是 DNA 条形码鉴定最优的序列之一, 物种水平的鉴定成功率高达 92.7% (曾旭等, 2011)。在本研究中, ITS1 和 ITS2 作为 DNA 条形码序列可以有效的鉴定刺桐姬小蜂, 而且对采自福建厦门和海南三亚的样品, 都能无差异扩增出目的条带。单只刺桐姬小蜂特异引物灵敏度检测也证明特异性引物扩增灵敏度高。胯姬小蜂属全世界目前有 39 种, 包括 *Q. baldufi*, *Q. haitiensis*, *Q. lasiocerus*, *Q. malhamensis* 等, 但这些种类标本还无法收集到, 也查不到相应的 ITS 序列, 因而无法进一步对特异引物进行验证。目前, 有很多学者担忧, DNA 条形码的出现可能会削弱传统形态学的发展, 然而, 即便是最先提出 DNA 条形码概念的 Hebert 也认为传统分类学的地位是不可替代的。因此, 传统形态学方法结合 DNA 条形码技术的综合分析是探索昆虫多样性和种类鉴定的必然发展趋势。

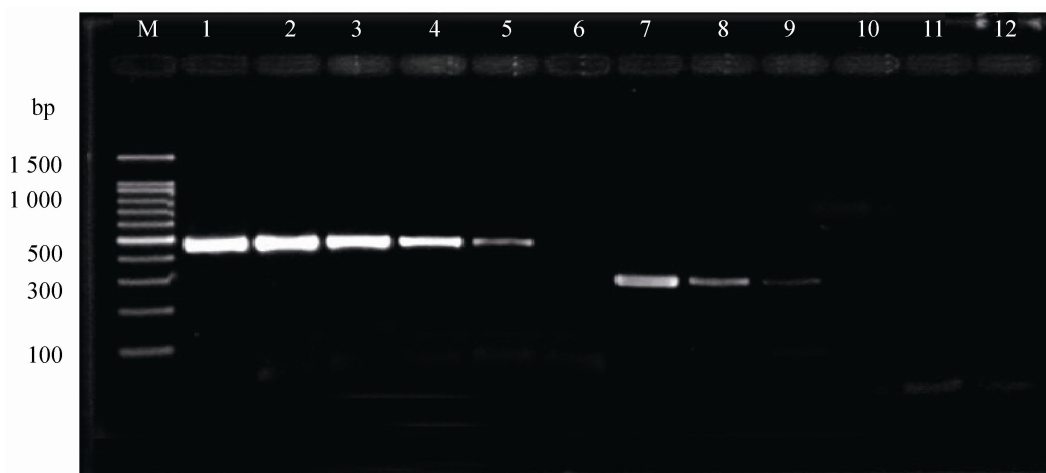


图 4 单只刺桐姬小蜂特异性引物灵敏度检测 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 4 PCR amplification by using rDNA ITS1 and ITS2 species-specific primers of individual *Quadrastichus erythrinae*

M : 100 bp 标准分子量 100 bp DNA marker ; 1-6 ITS1 特异引物灵敏度检测 Sensitive detection of ITS1 diagnostic primers (1 : 10^0 ; 2 : 10^{-1} ; 3 : 10^{-2} ; 4 : 10^{-3} ; 5 : 10^{-4} ; 6 : 10^{-5}) ; 7-12 ITS2 特异引物灵敏度检测 Sensitive detection of ITS2 diagnostic primers (7 : 10^0 ; 8 : 10^{-1} ; 9 : 10^{-2} ; 10 : 10^{-3} ; 11 : 10^{-4} ; 12 : 10^{-5}) .

参考文献 (References)

- Carpenter JM, Wheeler WC, 1999. Towards simultaneous analysis of morphological and molecular data in Hymenoptera. *Zool. Scri.*, 28(1/2): 251–260.
- Dai QY, Gao Q, Wu CS, Douglas C, Zhu CD, Zhang AB, 2012. Phylogenetic reconstruction and DNA barcoding for closely related pine moth species (*Dendrolimus*) in China with multiple gene markers. *PLoS ONE*, 7(4): e32544.
- Kim IK, Delvare G, La Salle J, 2004. A new species of *Quadrastichus* (Hymenoptera: Eulophidae): A gall-inducing pest on *Erythrina* spp. (Fabaceae). *J. Hym. Res.*, 13(2): 243–249.
- Li HM, Xiao H, Peng H, Han HX, Xue DY, 2006. Potential global range expansion of a new invasive species, the erythrina gall wasp: *Quadrastichus erythrinae* Kim (Insecta: Hymenoptera: Eulophidae). *The Raffles Bulletin of Zoology*, 54(2): 229–234.
- Sha ZL, Zhu CD, Murphy RW, Huang DW, 2007. *Diglyphus isaea* (Hymenoptera: Eulophidae): a probable complex of cryptic species that forms important biological control agent of agromyzid leaf miners. *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, 45(2): 128–135.
- 黄蓬英, 方元炜, 黄建, 林石明, 王宏毅, 2005. 中国大陆一新外来入侵种—刺桐姬小蜂. *昆虫知识*, 42(6): 731–733. [HUANG PY, FANG YWei, HUANG J, LIN SM, WANG HY. 2005. A new invasive alien species, *Quadrastichus erythrinae*, in mainland of China. *Chinese Bulletin of Entomology*, 42(6): 731–733.]
- 潘力, 崔翠, 王斌, 2010. 一种用于 PCR 扩增的丝状真菌 DNA 提取方法. *微生物学通报*, 37(3): 450–453. [Pan L, CUI C, WANG B. 2010. PCR Amplification for filamentous fungi DNA Extraction. *Microbiology*, 37(3): 450–453.]
- 乔玮娜, 万方浩, 张爱兵, 闵亮, 张桂芬, 2012. DNA 条形码技术在田间常见蓟马种类识别中的应用. *昆虫学报*, 55(3): 344–356. [QIAO WN, WAN FH, ZHANG AB, MIN L, ZHANG GF. 2012. Application of DNA barcoding technology for species identification of common thrips (Insecta: Thysanoptera) in China. *Acta Entomological Sinica*, 55(3): 344–356.]
- 石林春, 宋经文, 李莉, 姚辉, 陈士林, 2011. 基于 ITS2 条形码序列的京大戟及其易混品的 DNA 分子鉴定. *环球医药*, 4(2): 103–108. [SHI LC, SONG JY, Li L, YAO H, CHEN SL. 2011. Molecular identification of *Euphorbia pekinensis* and its adulterants using ITS2 barcode sequence. *Global Traditional Chinese Medicine*, 4(2): 103–108.]
- 杨耀华, 2013. DNA 条形码技术的应用进展. *中国医药指南*, 11(17): 484–485. [Yang YH. Overview on DNA barcoding technology. *Guide of Chinamedicine*, 11(17): 484–485.]
- 曾旭, 李莉, 业宁, 姚辉, 刘志华, 秦民坚, 2011. 基于 ITS2 条形码的中药材威灵仙与其易混伪品的鉴定. *环球中医药*, 4(4): 264–269. [ZENG X, LI L, YE N, Yao H, LIU ZH. 2011. Molecular identification of radix et rhizome clematis and its adulterants based on ITS2 DNA barcode. *Global traditional Chinese Medicine*, 4(4): 264–269.]