

基于 TaqMan 实时荧光定量 PCR 技术的 西花蓟马快速检测^{*}

吴霞^{1**} 张桂芬^{1,2***} 万方浩^{1,2***}

(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 100081)

摘 要 西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* (Pergande) 是世界性害虫, 2003 年在我国首次发生危害。针对西花蓟马与其他种类蓟马形态相似、难以快速区分的问题, 本文在 SCAR 标记基础上, 采用 TaqMan 实时荧光定量 PCR 技术, 设计 1 对特异性引物和 1 条 MGB 探针, 扩增出大小为 138 bp 的特异片段。以质粒 DNA 为标准品建立了标准曲线 ($R^2 = 0.9965$), 种特异性检验结果显示, 该引物和探针只能检测到西花蓟马的荧光信号, 而对其他种类的蓟马不具有检测能力。并且可以定量检测西花蓟马不同虫态靶标 DNA 片段的拷贝数。该检测体系重复性强、稳定性高, 在口岸检疫以及植物种苗及其产品调运中的有害生物检测和监测中具有重要意义。

关键词 西花蓟马, TaqMan-MGB 探针, 实时荧光定量 PCR, 快速检测, SCAR 标记

TaqMan real-time fluorescent quantitative PCR for identification of *Frankliniella occidentalis*

WU Xia^{1**} ZHANG Gui-Fen^{1,2***} WAN Fang-Hao^{1,2***}

(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 100081, China)

Abstract The western flower thrip, *Frankliniella occidentalis* (Pergande), an invasive species worldwide, was first reported in Beijing in 2003. Morphological identification of thrips is difficult because of their small size, high degree of similarity, and polymorphism. In contrast, molecular identification is not hindered by phenotypic polymorphism, or the sex or stage of development of the target species. We evaluated the effectiveness of TaqMan real-time fluorescent quantitative PCR to identify WFT, for which we developed a pair of species specific primers and a MGB probe. The amplified fragment size was 138 bp. Standard points made using serial dilutions of plasmid DNA had a strong linear relationship with the detected C_t values ($R^2 = 0.9965$), making the C_t value a reliable way to quantify DNA. Specificity tests performed with the TaqMan-MGB probe and primer sets showed that all *F. occidentalis* specimens were detected and that there were no cross reactions with 8 other thrip species, including *F. intonsa* (Trybom) and *F. tenuicornis* (Uzel). Moreover, the system could quantitatively detect target DNA copies from all developmental stages of *F. occidentalis* with high repeatability and stability. The results indicate that our detection system has high sensitivity and specificity and can be used for on-site testing of samples at ports-of-entry and during transportation of plant seedlings and products.

Key words *Frankliniella occidentalis*, TaqMan-MGB, real-time fluorescent quantitative PCR, rapid detection, SCAR marker

西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* (Pergande) 属, 原产于北美, 现已分布于欧洲、亚洲、非洲等地区 (Kirk and Terry, 2003)。我国于 2003 年在北京

* 资助项目: 国家“973”计划项目 (2009CB119200)、公益性行业 (农业) 科研专项 (201103026)、国家自然科学基金 (30971967)。

** E-mail: jiebaiwuxia1985@126.com

*** 通讯作者, E-mail: guifenzhang3@mail.caas.net.cn; wanfh@mail.caas.net.cn

稿日期: 2011-03-29, 接受日期: 2010-04-13

首次发现该虫为害(张友军等,2003),之后在云南(徐家菊等,2005)、山东(郑长英等,2007)等地陆续发生。西花蓟马是一种杂食性害虫,寄主范围非常广,主要通过直接取食和传播病毒危害包括蔬菜、花卉、大田作物和果树在内的500多种植物,并造成严重损失(Kritzman *et al.*, 2002; Moritz, 2002)。西花蓟马体型微小,隐蔽性强,卵产在寄主植物组织中,幼期和成虫期在花及幼嫩部位取食,前蛹和蛹期在土壤中度过,因此常规的检疫处理措施难以收到理想的效果。此外,西花蓟马与其他种类的蓟马形态相似,传统的形态学识别法难以快速准确鉴定,因此在蔬菜、花卉、种苗等植物材料调运中,被传带的几率极大(钟锋等,2009)。显然,准确快速的鉴定技术是有效阻止西花蓟马进一步传播扩散的首要条件。

近年来随着分子生物学技术的快速发展,国内外运用该技术检测蓟马的方法逐渐增多,例如,限制片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)标记技术可以区分西花蓟马与其他9种蓟马(Brunner *et al.*, 2002; Toda and Komazaki, 2002),基于PCR以及线粒体DNA细胞色素氧化酶亚基I(mitochondria cytochrome oxidase subunit I, mtDNA COI)基因的直接测序技术可以准确鉴定西花蓟马及其他8种常见蓟马种类(游中华等,2007)。此外,冯毅等(2009)利用DNA条形码信息研制虚拟基因芯片,建立了快速高效鉴定3种花蓟马属害虫的方法。周力兵等(2007)和孟祥钦等(2010)分别根据mtDNA COI基因和基因组DNA的部分序列构建了西花蓟马快速检测体系。然而,上述标记技术均需要对PCR产物进行后处理,如酶切(RFLP技术)、测序(COI技术)或电泳检测(SCAR(sequence characterized amplified regions 特征序列扩增区域)标记技术)等,然后才能明确其检测结果。实时荧光定量PCR技术于1996年由美国Applied Biosystems公司推出,该技术不仅实现了PCR从定性检测到定量检测的飞跃,而且与常规PCR相比,具有特异性更强、自动化程度更高、能有效解决PCR的污染问题等特点。该技术通常使用2种荧光化学,即荧光探针和荧光染料,其中荧光探针比荧光染料特异性强,而TaqMan-MGB荧光探针又比常规TaqMan荧光探针更精确、分辨率更高,因

此是近几年核酸实时定性定量检测的首选方法(Ginzinger, 2002; Yang *et al.*, 2005),已广泛用于转基因研究、线虫检测、细菌、真菌、病毒检测等。如刘渠等(2010)以TaqMan-MGB荧光定量PCR检测饮用水中的大肠菌群,为饮用水水质快速检测标准的建立提供了依据。此外,TaqMan-MGB实时荧光PCR技术还可用于转基因大豆中Bt毒蛋白的定量检测研究,以及配方食品、饲料等加工产品中转基因成分含量的测定(黄东东等,2008)。同时,TaqMan-MGB探针技术在国际重大检疫性有害生物松材线虫的定量检测分析中亦发挥了巨大作用(葛建军等,2005)。

本研究针对西花蓟马仅在局部区域发生,极易随蔬菜、花卉以及苗木等的运输进一步传播扩散,但难以快速准确检测的问题,采用TaqMan-MGB探针法研究其快速检测鉴定技术,以田间常见的其他8种蓟马(包括:花蓟马*F. intonsa* (Trybom)、禾花蓟马*F. tenuicornis* (Uzel)、黄胸蓟马*Thrips hawaiiensis* (Morgan)、亮蓟马*T. flevas* (Schrank)、八节黄蓟马*T. flavidulus* (Bagnall)、稻筒管蓟马*Haplothrips aculeatus* (Fabricius)、苏丹呆蓟马*Anaphothrips sudanensis* (Trybom)和菊花蓟马*Microcephalothrips abdominalis* (Crawford))为靶标进行种特异性检验,并以西花蓟马不同虫态单个体的DNA为模板进行灵敏性检验,以不同浓度以及不同储存期的质粒DNA为模板进行重复性和稳定性检验。研究结果为西花蓟马快速检测体系的建立提供了依据,为西花蓟马的有效阻截提供了技术保障。

1 材料与方法

1.1 材料

供试虫源:西花蓟马种群以市售扁豆饲养于中国农业科学院植物保护研究所南区养虫室,国内发生的其他种类的蓟马均采自田间,具体采集信息见表1。其中,西花蓟马由蓟马系统分类学专家Mound LA教授(CSIRO Entomology, Australia)鉴定;其他种类的蓟马由闵亮同学经过蓟马形态学鉴定技能培训(主讲专家:华南农业大学资源环境学院张维球教授和童晓立教授)后依据相关资料(韩运发,1997;张维球等,1999)确认。

表 1 用于 TaqMan-MGB 引物和探针种特异性检验的蓟马种类

Table 1 Thrips species used for species specificity test by TaqMan-MGB primers and probe

种类 Species	寄主 Host plant	采集地点 Collection locality	采集时间 Collecting date
西花蓟马 <i>F. occidentalis</i>	西瓜 Watermelon	北京昌平 Changping, Beijing	2009. 8
花蓟马 <i>F. intonsa</i>	金盏菊 Pot marigold	北京昌平 Changping, Beijing	2009. 5
禾花蓟马 <i>F. tenuicornis</i>	狗尾草 Green bristlegrass herb	河北邯郸赵苑公园 Zhaoyuan Park, Handan, Hebei	2009. 6
黄胸蓟马 <i>T. hawaiiensis</i>	蜀葵 Hollyhock	山西太原龙潭公园 Longtan Park, Taiyuan, Shanxi	2009. 6
亮蓟马 <i>T. flevas</i>	荆条 Vervain family	河北秦皇岛人民公园 People's Park, Qinghuangdao, Hebei	2009. 7
八节黄蓟马 <i>T. flavidulus</i>	玫瑰 Rose	河南漯河大学 Luohe University, Henan	2009. 5
稻筒管蓟马 <i>H. aculeatus</i>	杂草 Weed	河南洛阳西苑公园 Xiyuan Park, Luoyang, Henan	2009. 5
苏丹呆蓟马 <i>A. sudanensis</i>	白三叶草 White trefoil	河北邯郸丛台公园 Congtai Park, Handan, Hebei	2009. 6
菊花蓟马 <i>M. abdominalis</i>	金盏菊 Pot marigold	河北唐山凤凰山公园 Fenghuang Hill Park, Tangshan, Hebei	2009. 7

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 蓟马类昆虫基因组 DNA 的提取参照周志湘等(2007)的 SDS 方法并稍加改进。将单头西花蓟马/其他种类蓟马置于滴有 20 μ L 提取缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 1% SDS, 20 mmol/L NaCl, pH 8.0)的 parafilm 膜上,以 PCR 管底部为匀浆器充分研磨,匀浆液移入 1.5 mL 离心管;然后以 200 μ L 缓冲液分 4 次冲洗匀浆器、合并混匀;加入 5 μ L 蛋白酶 K (20 mg/mL),充分混匀后于 65 $^{\circ}$ C 水浴 1 h (中途混匀 1 次);加入 220 μ L 氯仿/异戊醇(V:V = 24:1),轻柔混匀后,冰浴 30 min;然后 4 $^{\circ}$ C 12 000 rpm 离心 20 min,吸取上清液,加入 440 μ L 预冷无水乙醇,轻柔混匀后于 -40 $^{\circ}$ C 放置 30 min;4 $^{\circ}$ C 12 000 rpm 离心 15 min,小心弃去上清液。加入 500 μ L 预冷 75% 乙醇洗涤 4 $^{\circ}$ C 12 000 rpm 离心 15 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。每管加入 20 μ L 超纯水,充分溶解后于 -30 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 质粒标准品 DNA 的制备 参照孟祥钦等(2010)的方法,获得基于 SCAR 标记的西花蓟马特异性扩增条带(约 300 bp),切胶回收后以 PEGM-T easy 载体进行连接转化(Top 10 大肠杆菌感受态细胞)(天根生化科技(北京)有限公

司),克隆后送上海英骏生物技术有限公司测序。碱基序列比对结果显示,该片段为 320 bp,与 GenBank 中已有的西花蓟马基因组 DNA 片段(569 bp, GenBank 登录号 GU045557;孟祥钦等,2010)中 37~356 bp 的碱基序列完全吻合。同时,从菌液中提取质粒 DNA,以生物分光光度计(德国 Eppendorf, 22331 Hamburg)测定其浓度为 220 μ g/mL,根据公式:质粒 DNA 拷贝数/ μ L = 质粒 DNA 质量/ μ L $\div$ 平均分子量 $\times 6.023 \times 10^{23}$,得出每微升质粒中靶标 DNA 片段的拷贝数为 1.217×10^{11} 。然后以 10 倍进行递减梯度稀释成 5 个浓度,稀释样品保存于 -70 $^{\circ}$ C,作为标准质粒用于建立标准曲线。

1.2.3 西花蓟马特异性引物与探针的设计 根据特异性片段的测序结果,设计西花蓟马 TaqMan-MGB 荧光引物 FOQWF/FOQWR 和探针 FOQWP,并由上海基康生物有限公司协助合成。

1.2.4 定量 PCR 检测的反应体系与扩增条件 定量 PCR 扩增反应以 96 孔光学板在荧光定量 PCR 扩增仪(美国 ABI 7500)上进行,反应体系为 10 μ L,其中 PCR Master Mixture (2 $\times$) 5 μ L (美国 Takara)、上游引物(20 μ M) 0.4 μ L、下游引物(20 μ M) 0.4 μ L(上海生工生物技术有限公司合成)、DNA 模板 2 μ L、TaqMan 探针(10 PM) 0.1 μ L (上

海基康生物技术有限公司合成)、Rox 0.1 μL (美国 Takara)、ddH₂O 2.0 μL 。PCR 反应中以水为阴性对照,质粒 DNA 为阳性对照。扩增程序为:初始步骤 95℃ 3 min,然后进入 95℃ 变性 15 s,60℃ 退火延伸 1 min(采集荧光信号),扩增 40 个循环,耗时约 80 min。

1.2.5 标准曲线的建立 以西花蓟马质粒 DNA 为标准品,进行 10 倍递减梯度稀释为 $1.217 \times 10^7 \sim 1.217 \times 10^3$ (copies/ μL) 5 个浓度,每一浓度取 2 μL 作为模板,以 FOQWF/FOQWR 和 FOQWP 作为实时荧光定量 PCR 扩增的引物和探针,进行定量 PCR 检测,重复 4 次。然后以质粒 DNA 浓度及其相应的临界循环次数 (C_t 值) 绘制标准曲线,并进行相关性分析。

1.2.6 荧光引物和探针的种特异性检验 鉴于在扩增西花蓟马基因组 DNA (320 bp) 片段的 SCAR 引物 (FOMF/FOMR) 的特异性检验中已涉及了 41 种蓟马 (孟祥钦等, 2010), 因此本研究仅选用其中 8 种田间常见的其他蓟马种类 (包括 2 种花蓟马属昆虫) 进行特异性检验 (表 1)。以单头蓟马成虫的 DNA 为模板,以 FOQWF/FOQWR 和 FOQWP 作为实时荧光定量 PCR 引物和探针,质粒 DNA 为阳性对照、超纯水为阴性对照,进行 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测,检测方法同 1.2.4。

1.2.7 荧光引物和探针的灵敏性检测 以不同虫态和性别 (卵、1 龄若虫、2 龄若虫、前蛹、蛹、雄性成虫、雌性成虫) 的单头/粒西花蓟马 DNA 为模

板,以 FOQWF/FOQWR 和 FOQWP 作为实时荧光定量 PCR 引物和探针,质粒 DNA 为阳性对照、超纯水为阴性对照,进行 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测,检测方法同 1.2.4。每一虫态或性别分别检测 3 头/粒。

1.2.8 重复性和稳定性测定 以浓度分别为 1.217×10^7 、 1.217×10^5 、 1.217×10^3 (拷贝数/ μL) 的质粒 DNA 为模板,进行荧光定量 PCR 扩增,分别测定 3 次,然后以 3 次重复所得的各浓度 C_t 值计算其标准差及变异系数。将上述检测后的标准品于 -20℃ 保存 30 d 后,再进行检测;比较前后 2 次的扩增结果,并进行统计分析。

1.3 数据统计与分析

数据是从荧光定量 PCR 仪中直接导出的 DNA 拷贝数,然后用 EXCEL 求平均值和标准方差。

2 结果与分析

2.1 西花蓟马 TaqMan-MGB 定量 PCR 检测体系引物和探针的设计

根据西花蓟马特异性片段的测序结果,设计一对特异性引物 (FOQWF/FOQWR) 和一条与模板互补的基因特异性探针 (FOQWP),引物和探针的碱基序列如表 2 所示。其中,探针的 5' 端以 FAM 报告荧光基团标记,3' 端以 MGB 淬灭基团标记,其扩增片段长度为 138 bp。

表 2 西花蓟马 TaqMan-MGB 定量检测引物和探针的碱基序列

Table 2 Sequences of primers and probe used in TaqMan-MGB quantitative detection of *Frankliniella occidentalis*

名称 Name	碱基序列 Base sequence (5'~3')
上游引物 Upstream primer (FOQWF)	GGGAAGAAGAAGACTGCCACTATG
下游引物 Downstream primer (FOQWR)	GGGTCAGCAGGTGGAGTTTACT
探针 Probe (FOQWP)	ACCCACTTCATCTTGCT

2.2 标准曲线的建立

以 10 倍递减梯度稀释所获得的 5 个浓度的质粒 DNA 为模板,进行实时荧光定量 PCR 检测,然后以 C_t 值为纵坐标,以不同浓度靶标 DNA 片段拷贝数的对数值为横坐标,绘制标准曲线并进行相关性分析。结果显示,靶标 DNA 片段的拷贝数

与 C_t 值间显著相关,其相关关系式为 $Y = -3.014x + 39.979$ ($R^2 = 0.9965$) (图 1),完全可以用于西花蓟马的定量检测分析。

2.3 荧光引物和探针的种特异性检验

以西花蓟马以及田间常见的其他 8 种蓟马 DNA 为模板进行定量 PCR 检测,结果显示,只有

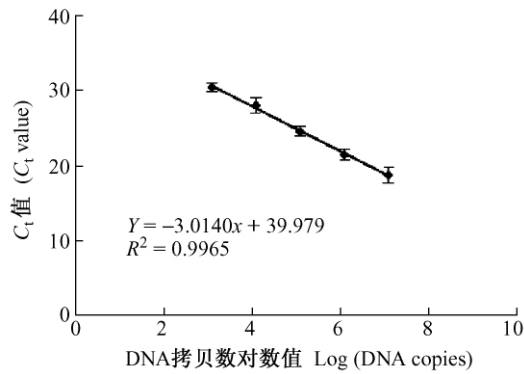


图 1 西花蓟马靶标 DNA 片段标准曲线

Fig. 1 Standard curve of *Frankliniella occidentalis* target DNA fragment

西花蓟马发出强烈的荧光信号,其 C_t 值为 25.00,而其他田间常见的 8 种蓟马的荧光信号十分微弱, C_t 值为 36.63 ~ 38.32,均低于阴性对照(C_t 值为 36.45)(图 2)。进而表明,该检测体系完全可用于西花蓟马的检测鉴定分析。

2.4 荧光引物和探针的灵敏性检测

分别以不同虫态西花蓟马的单一个体 DNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 检测,结果显示,该定量检测体系不仅能检测单头成虫、前蛹以及蛹,而且还可检测二龄若虫以及初孵若虫;同时,对单粒卵亦具有很好的检测效果,其靶标 DNA 片段的含量为 1 729.00 拷贝数/ μ L(表 3)。

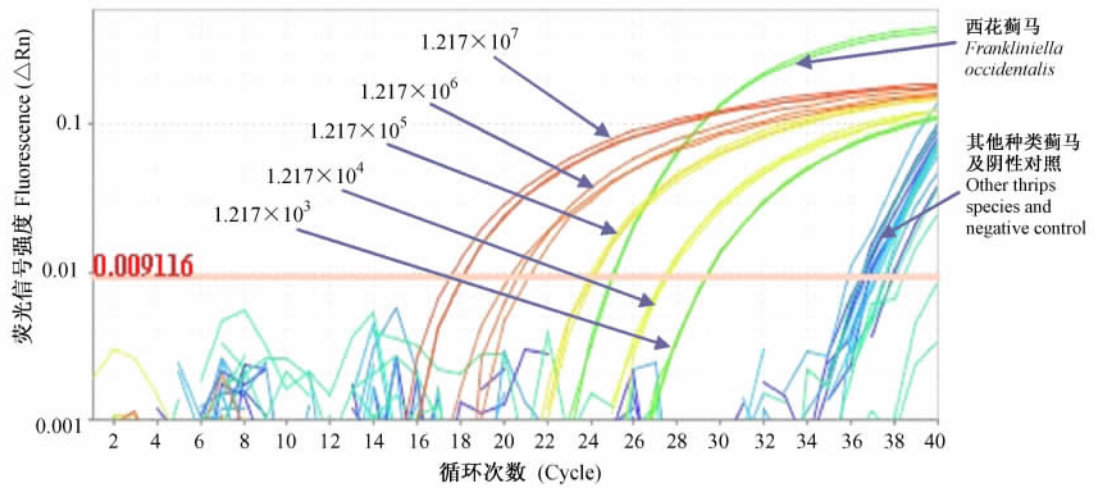


图 2 荧光引物和探针的种特异性检验

Fig. 2 Species specificity test of TaqMan-MGB probe and primer sets

表 3 西花蓟马不同虫态单一个体靶标 DNA 的定量检测(平均值 ± 标准偏差)

Table 3 Quantitative detection of target DNA fragment in individual *Frankliniella occidentalis* at different development stages (mean ± SD)

虫态 Development stage	C_t 值 C_t value	靶标 DNA 拷贝数 No. target DNA copies
卵 Egg	29.05 ± 0.13	1 729.00 ± 29.81
1 龄若虫 First nymph	28.66 ± 0.21	3 591.33 ± 936.48
2 龄若虫 Second nymph	28.04 ± 0.07	5 045.56 ± 391.60
前蛹 Pre-pupa	27.39 ± 0.37	7 081.15 ± 2971.18
蛹 Pupa	26.89 ± 0.47	8 860.89 ± 486.61
雄性成虫 Male	27.53 ± 0.62	6 068.21 ± 339.61
雌性成虫 Female	25.48 ± 0.06	36 692.80 ± 4068.35
水 Water (Negative control)	36.29 ± 0.614	0

表 4 重复性和稳定性检测
Table 4 Testing of repeatability and stability

靶标 DNA 拷贝数 No. target DNA copies (copies/ μ L)	C_t 值 (平均值 $\pm$ 标准偏差) C_t value (mean $\pm$ SD)		变异系数 (%) Coefficient of variation (CV) (%)
	新鲜配制 Freshly obtained	-20℃ 储存 30 d Keep at -20℃ for 30 d	
1.217×10^7	19.30 $\pm$ 0.21	19.70 $\pm$ 0.57	1.09
1.217×10^5	24.89 $\pm$ 0.36	24.75 $\pm$ 0.45	1.44
1.217×10^3	30.38 $\pm$ 0.63	30.06 $\pm$ 0.76	2.07

2.5 重复性和稳定性检测

分别以高、中、低 3 个浓度的质粒 DNA 为模板进行重复性和稳定性检测,结果显示 3 种浓度 C_t 值的变异系数分别为 1.09%、1.44% 和 2.07%,均低于 5%;将储存 30 d 前后的不同浓度质粒 DNA 的检测结果进行比较分析,其 P 值分别为 0.41、0.75、0.67,均大于 0.05(表 4)。表明,本研究所建立的西花蓟马定量检测体系具有良好的重复性和稳定性。

3 讨论

西花蓟马是世界性害虫,2003 年入侵我国(张友军等,2003)。适生性分析显示,我国大部分地区为西花蓟马的潜在分布区(程俊峰等,2006;陈洪俊等,2007)。鉴于西花蓟马仅在我国局部区域发生,而且其进一步扩散危害的可能性极大(戴霖等,2005),因此研究建立西花蓟马快速检测技术体系,是有效阻截其在我国传播扩散的关键环节。本研究采用的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 技术特异性强,可以将西花蓟马与我国田间常见的 8 种其他种类的蓟马(包括 2 种花蓟马属昆虫)区分开。同时,该技术重复性好,稳定性高,高、中、低 3 种浓度靶标 DNA 片段 C_t 值的变异系数均低于 5% (1.09% ~ 2.07%);储存期为 30 d 的质粒 DNA 其 C_t 值与储存前没有明显差异, P 值均大于 0.05 (0.41 ~ 0.75)。此外该技术灵敏度高,可以有效检测各虫态的西花蓟马乃至卵;而且借助所建立的标准曲线($R^2 = 0.9965$),可以精准定量各检测虫态中靶标 DNA 片段的拷贝数。该技术体系不仅完全可以用于口岸及蔬菜、花卉、种苗等调运中西花蓟马的检测及其种群扩张趋势监测,而且还可用于本地捕食性天敌对西花蓟马捕食作用大小的定量评价分析。

近年来,已有多种分子标记技术用于西花蓟

马的识别鉴定。如 Brunner 等(2002)根据 mtDNA COI 基因中 433 bp 的扩增产物,结合序列测定和 RFLP 分析,有效地将西花蓟马与其他 9 种蓟马区分开。游中华等(2007)以 mtDNA COI 基因片段作为分子标记,通过 PCR 产物直接测序法,有效鉴定了包括西花蓟马在内的 9 种常见蓟马种类。上述 2 种分子标记技术结果稳定可靠,但是需要对 PCR 产物进行酶切消化或测序及序列分析,而且检测周期较长。周力兵等(2007)利用 Brunner 等(2002)设计的简并引物扩增出 6 种蓟马的 mtDNA COI 基因片段(450 bp),通过序列测定,设计了 2 对西花蓟马特异性引物,该 2 对引物可以将西花蓟马的成虫、若虫、蛹与其他 5 种蓟马区分开,且无需测序及序列分析。孟祥钦等(2010)以 SCAR 标记技术获得西花蓟马特异性引物 1 对,并对该引物进行了特异性检验及灵敏度测定,建立了西花蓟马快速定性检测技术体系;该技术体系不仅可以检测西花蓟马单粒卵以及单头若虫、蛹或成虫,而且还可准确检测出寄主植物组织中是否带有卵。但是这 2 种方法均需要对 PCR 产物进行电泳检测,否则无法明确检测结果。冯毅等(2009)利用 COI 基因条形码信息设计虚拟基因芯片,建立了快速鉴定 3 种花蓟马属昆虫的方法,但尚需进一步补充完善。本研究在 SCAR 标记基础上(孟祥钦等,2010),采用 TaqMan 实时荧光定量 PCR 技术,设计定量检测西花蓟马的荧光引物 1 对(FOQWF/FOQWR)、MGB 探针 1 条(FOQWP),MGB 探针不仅避免了假阳性、增强了特异性及其检测灵敏度,而且还可以精准定量不同虫态西花蓟马个体中靶标 DNA 片段的拷贝数;此外, TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测技术操作方便快捷,仅需 80 min 即可完成 96 份未知样本 DNA 的检测,而且结果稳定可靠、重现性好。本实验结果与 Huang 等(2010)的研究结果一致,西花蓟马定

量检测技术体系一旦构建,便可用于检测大量样本,对口岸检疫以及植物种苗及其产品调运中的检疫检验、入侵物种传播扩散的有效阻截、及其扩张趋势的监测和机制探讨等均具有重要意义;同时,该技术体系还可用于精准评价本地天敌对西花蓟马控制作用研究。

参考文献 (References)

- Brunner PC, Fleming C, Frey JE, 2002. A molecular identification key for economically important thrips species (Thysanoptera: Thripidae) using direct sequencing and a PCR-RFLP based approach. *Agr. Forest Entomol.*, 4(2): 127—136.
- 程俊峰, 万方浩, 郭建英, 2006. 入侵昆虫西花蓟马的潜在适生区分析. *昆虫学报*, 49(3): 438—446.
- 陈洪俊, 刘海军, 李镇宇, 马晓光, 2007. 西花蓟马在我国的潜在分布区预测. *植物检疫*, 21(3): 160—163.
- 戴霖, 杜予州, 鞠瑞亭, 顾杰, 2005. 危险性害虫西花蓟马的传播现状. *华东昆虫学报*, 14(2): 150—154.
- 冯毅, 王莉, 白云峰, 王洁, 冯纪年, 2009. 基于 COI 序列快速鉴定花蓟马的 DNA 条形码芯片初探. *生物技术通报*, (8): 70—73.
- 葛建军, 曹爱新, 刘先宝, 陈长法, 2005. 应用 TaqMan-MGB 探针进行松材线虫的实时荧光定量检测技术研究. *植物病理学报*, 35(6): 52—58.
- Ginzinger DG, 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the main stream. *Exp. Hematol.*, 30: 503—512.
- 韩运发, 1997. 中国经济昆虫志, 第五十五册, 缨翅目. 北京: 科学出版社. 1—513.
- 黄东东, 翁少萍, 吕玲, 常迪, 何建国, 2008. TaqMan MGB 实时荧光 PCR 对转基因大豆定量检测的研究. *中山大学学报(自然科学版)*, 47(3): 140—142.
- Huang KS, Lee SE, Yeh Y, Shen GS, Mei E, Chang CM, 2010. Taqman real-time quantitative PCR for identification of western flower thrips (*Frankliniella occidentalis*) for plant quarantine. *Biol. Lett.*, 6: 554—557.
- Kirk WDJ, Terry LI, 2003. The spread of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Agr. Forest Entomol.*, 5: 301—310.
- Kritzman A, Gera A, Raccach B, Van Lent JWM, Peter D, 2002. The route of tomato spotted wilt virus inside the thrips body in relation to transmission efficiency. *Arch. Virol.*, 147: 2143—2156.
- 刘渠, 李涌, 陈应坚, 苏雪媚, 2010. 饮用水大肠菌群 Taqman—MGB 荧光定量 PCR 检测方法研究. *现代预防医学*, 7(12): 2312—2317.
- Moritz G, 2002. The biology of thrips is not the biology of their adults: a developmental view // Marullo R, Mound LA (eds). *Thrips and Tospoviruses. Proceedings of the 7th International Symposium on Thysanoptera*, Reggio Calabria, Italy. 259—267.
- 孟祥钦, 闵亮, 万方浩, 周忠实, 王文凯, 张桂芬, 2010. 西花蓟马的 SCAR 分子检测技术. *昆虫学报*, 53(3): 323—330.
- Toda S, Komazaki S, 2002. Identification of thrips species (Thysanoptera: Thripidae) on Japanese fruit trees by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of the ribosomal ITS2 region. *Bull. Entomol. Res.*, 92: 359—363.
- 徐家菊, 韦丽莉, 禹崇云, 包丽琼, 林兴华, 彭贵清, 赵满云, 2005. 临沧市新发现外来有害生物—西花蓟马. *植物检疫*, 19(5): 23—24.
- 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.
- Yang FL, Jia WX, Yue H, Chen X, Xie Y, Zen W, Yang WQ, 2005. Development of quantitative real-time polymerase chain reaction for duck enteritis virus DNA. *Avian Dis.*, 49: 397—400.
- 张维球, 童晓立, 罗肖南, 卓文禧, 1999. 缨翅目 Thysanoptera // 黄邦侃 主编. 福建昆虫志(第一卷). 福州: 福建科学技术出版社. 348—395.
- 张友军, 吴青君, 徐宝云, 朱国仁, 2003. 危险性外来入侵生物—西花蓟马在北京发生危害. *植物保护*, 29(4): 58—59.
- 郑长英, 刘云虹, 张乃芹, 赵希丽, 2007. 山东省发现外来入侵有害生物西花蓟马. *青岛农业大学学报(自然科学版)*, 24(3): 172—174.
- 钟锋, 吕利华, 高燕, 何余容, 李小玺, 张金强, 李世茂, 2009. 西花蓟马的危害及生物防治研究进展. *广东农业科学*, 8: 120—123.
- 周力兵, 刘忠善, 李春艳, 丁元明, 2007. PCR 法鉴定西花蓟马. *植物检疫*, 21(2): 78—81.
- 周志湘, 万方浩, 张桂芬, 陈斌, 2007. 烟粉虱基因组 DNA 快速提取方法. *植物保护*, 33(5): 131—133.