

基于 mtCO I 基因的三种稻飞虱 DNA 条形码构建及应用

谢家楠 郭建军 汪学俭 金道超*

(贵州大学昆虫研究所, 贵州山地农业病虫害重点实验室, 贵阳 550025)

摘要: 为构建白背飞虱、褐飞虱、灰飞虱 3 种稻飞虱 DNA 条形码, 准确鉴定各虫态稻飞虱种类, 随机选取 35 个供试虫体提取全基因组 DNA, PCR 扩增其中线粒体细胞色素氧化酶 I (mtCO I) 基因, 分析所获得的基因组成特点, 计算 P 距离值, 构建系统发育树, 并对稻飞虱若虫、卵进行种类鉴定。PCR 扩增获得了长度为 706 bp 的稻飞虱 mtCO I 基因片段, 碱基组成特点种内、种间不同; 3 种稻飞虱的种间 P 距离值为 25.53% ~ 34.21%, 种内为 0 ~ 0.51%, 种间值明显高于种内; 系统发育树显示同种个体聚集在同一分支; 同种卵、若虫的 mtCO I 基因与已获得的成虫基因序列同源性最高值为 100%, P 距离值为 0。研究表明, 3 种稻飞虱的 DNA 条形码可基于 mtCO I 基因构建, 且可准确鉴定各虫态。

关键词: 稻飞虱; DNA 条形码; 卵和若虫; 鉴定

DNA barcoding application to three species of rice planthoppers based on mtCO I gene

Xie Jianan Guo Jianjun Wang Xuejian Jin Daochao*

(Provincial Key Laboratory for Agricultural Pest Management of Mountainous Regions, Institute of Entomology, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou Province, China)

Abstract: To construct the DNA barcoding of three species of main rice pest planthoppers, *Nilaparvata lugens* (Stål), *Sogatella furcifera* (Horváth) and *Laodelphax striatellus* (Fallén) and identify them correctly at different stages, 35 specimens were selected randomly and their DNAs were extracted, from which mtCO I gene was amplified by PCR, gene composition characters analyzed, P-distances calculated and phylogenetic tree constructed. At the same time, eggs and nymphs of these three species were identified using mtCO I gene. The results showed that mtCO I gene fragment obtained was 706 bp in length. The composition of base was different in intra- and inter-species. P-distances of inter-species were 25.53% - 34.21% in three of those rice planthoppers, respectively, with 0 - 0.51% of intra-species. Phylogenetic analysis showed that the specimens of the same species were clustered in a single clade. The mtCO I gene homology between eggs, nymphs of same species and obtained adults was as high as 100%, and P-distance was 0. The results indicated that the method of DNA barcoding based on the mtCO I gene should be recommended for identification of the rice planthoppers at different stages.

Key words: rice planthopper; DNA barcoding; egg and larva; identification

基金项目: 贵州省科技攻关项目(黔科合 NY 字[2010]3064 号), 贵州省科技厅自然科学研究项目(黔教 2010011), 国家“973”计划前期研究专项(2009CB125908)

作者简介: 谢家楠, 男, 1986 年生, 博士研究生, 研究方向为昆虫生理生化及分子生物学, E-mail: jnxie@foxmail.com

* 通讯作者(Author for correspondence), E-mail: daochojin@126.com

收稿日期: 2013 - 05 - 13

白背飞虱 *Sogatella furcifera* (Horváth)、褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål) 和灰飞虱 *Laodelphax striatellus* (Fallén) 是稻飞虱中的 3 个优势种^[1]。三者为害时不仅刺吸破坏水稻组织结构,而且传播多种水稻病毒,严重威胁水稻生产^[2-4]。准确把握田间种类构成及虫口基数是制定有效防治对策的前提,但传统形态分类法仅能鉴定成虫,对若虫、卵等虫态的鉴定有较大困难,因此研究适用于各虫态的分子分类方法进行辅助鉴定尤为迫切。

DNA 条形码技术作为分子分类方法,在物种区别和鉴定^[5-6]、发现新种和隐存种^[7-8]等方面取得了许多研究成果,特别是在鉴定卵、幼虫和外部形态特征不明显的虫体时表现出很大的优势^[9]。线粒体细胞色素氧化酶 I (mtCO I) 基因片段常被选作动物 DNA 条形码目标基因,但 mtCO I 基因是否符合白背飞虱、褐飞虱和灰飞虱这 3 种典型稻飞虱的 DNA 条形码标准,并满足对稻飞虱各虫态的鉴定等相关研究尚未深入开展。

本研究通过分析 3 种稻飞虱 29 个成虫 mtCO I 基因片段组成特点,从 P 距离值(基因序列间核苷酸差异率)和系统发育树角度探讨该基因作为稻飞虱 DNA 条形码的可行性,并构建 3 种稻飞虱 DNA 条形码,为稻飞虱的若虫、卵等虫态的准确鉴定提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试虫体:稻飞虱 DNA 条形码构建试验选用白背飞虱、褐飞虱和灰飞虱成虫虫体;验证稻飞虱 DNA 条形码技术鉴定应用的有效性试验采用卵和若虫虫体。以上供试虫体皆为 2010 年 5 月自贵州、云南、广西等地水稻植株上采集。试验时随机选取褐飞虱成虫 9 只,编号 NL1 ~ NL9;白背飞虱成虫 9 只,编号 SF1 ~ SF9;灰飞虱成虫 11 只,编号 LS1 ~ LS11;稻飞虱若虫 3 只,编号 X1 ~ X3;稻飞虱卵 3 粒,编号 X4 ~ X6。

试剂及仪器:分子量标准 DL2000 DNA marker、Taq DNA 聚合酶和 dNTP 等分子生物学试剂购自宝生物工程(大连)公司;血液/细胞/组织总基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;引物委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成;其它生化试剂均为国产分析纯;iCycler Thermal Cycler 型 PCR 扩增仪,BIO-RAD 公司。

1.2 方法

1.2.1 mtCO I 基因片段序列信息获得

总 DNA 提取:取 1.5 mL 离心管 35 支,标记后,将试验虫体分别置于离心管中,加入液氮充分碾磨。参照血液/细胞/组织总基因组 DNA 提取试剂盒操作说明,依次向离心管中加入试剂盒各组分:缓冲液 GA、蛋白酶 K、缓冲液 GB、无水乙醇、漂洗液 PW 和缓冲液 TE 等,并分别进行水浴、离心等操作,获得 100 μ L 总 DNA 提取物。取 5 μ L 提取物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳检测,其余保存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

PCR 扩增:引物参照 DNA 条形码技术扩增 mtCO I 基因片段通用引物序列^[10],分别为 LCO1490: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'; LCO2198: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'。PCR 反应体系:10 \times PCR 缓冲液(含 Mg^{2+}) 3 μ L、10 mmol/L dNTP 0.75 μ L、10 μ mol/L 正反向引物各 1 μ L、5 U/ μ L Taq 酶 0.3 μ L、模板 DNA 1 μ L(50 ng),双蒸水补足 30 μ L。PCR 程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,50 $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 总延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

测序及处理:PCR 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳检测后进行双向测序。测序结果经 Chromas 软件观察序列峰图质量、NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/index.html>)的 BLAST 模块进行同源性比对^[11]、DNASTar 软件 SeqMan 模块进行校正和拼接处理,最终获得准确、可信的目的 DNA 序列。

1.2.2 3 种稻飞虱 DNA 条形码构建与应用

DNA 条形码构建:由编号 NL1 ~ NL9、SF1 ~ SF9、LS1 ~ LS11 试验材料获得的 29 条目的 DNA 序列使用 Mega 4.1 软件进行种内、种间 DNA 序列碱基组成差异分析;种内、种间 P 距离值计算;构建系统发育树(邻接法, NJ),进行种内、种间聚集分析。使用 NCBI 网站 Submissions 模块(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/howto/submit-data>)将 29 条目的 DNA 序列上传至 NCBI 核酸数据库共享。

应用:由编号 X1 ~ X6 试验材料获得的 6 条目的 DNA 序列使用 NCBI 网站的 BLAST 模块与已上传 NCBI 核酸数据库的 29 条序列进行同源性比对,并使用 Mega 4.1 软件计算其与同源性最高序列间的 P 距离值,根据 P 距离值范围进行稻飞虱卵及若虫的鉴定,以验证构建的稻飞虱 DNA 条形码应用的有效性。

2 结果与分析

2.1 mtCO I 基因片段序列信息获得分析

采用试剂盒法成功提取了稻飞虱总 DNA。以提取物为模板进行 PCR 扩增,获得长度为 710 bp 左右的特异产物(图 1)。经测序及同源性比对,扩增产物为飞虱科 mtCO I 基因片段,长度为 706 bp。测序结果经校正、拼接、截取,获得所有供试虫体 mtCO I 片段基因序列信息。

2.2 3 种稻飞虱 DNA 条形码构建

2.2.1 序列碱基组成

种内:褐飞虱个体间碱基组成相同;白背飞虱、灰飞虱种内个体间碱基组成不同;3 种稻飞虱腺嘌呤与胸腺嘧啶(A + T)之和皆明显高于鸟嘌呤与胞嘧啶(G + C)之和(表 1)。

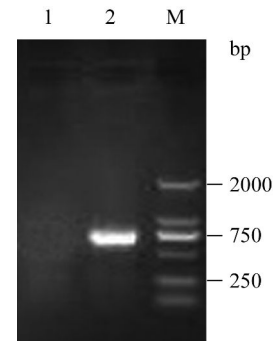


图 1 PCR 扩增电泳图

Fig. 1 Agarose-gel electrophoresis of PCR amplification products

1: 对照; 2: 细胞色素氧化酶 I 基因片段 PCR 扩增产物; M: 2000 bp DNA 标准分子量。1: Control; 2: PCR amplification product of mtCO I gene region; M: DL 2000 DNA marker.

表 1 mtCO I 基因片段序列碱基组成及 GenBank 登录号

Table 1 Base composition and GenBank accession numbers of mtCO I gene sequences

物种 Species	样本编号 Sample code	序列长度 Sequence size (bp)	腺嘌呤 含量 A content (%)	胸腺嘧啶 含量 T content (%)	鸟嘌呤 含量 G content (%)	胞嘧啶 含量 C content (%)	腺嘌呤与胸腺嘧啶 和含量 A + T content (%)	鸟嘌呤与胞嘧啶 和含量 G + C content (%)	GenBank 登录号 GenBank accession number
褐飞虱 <i>N. lugens</i>	NL 1	594	31.6	35.9	12.8	19.7	67.5	32.5	KC476387
	NL 2	594	31.6	35.9	12.8	19.7	67.5	32.5	KC476388
	NL 3	594	31.6	35.9	12.8	19.7	67.5	32.5	KC476389
	NL 4	594	31.6	35.9	12.8	19.7	67.5	32.5	KC476390
	NL 5	594	31.6	35.9	12.8	19.7	67.5	32.5	KC476391
	NL 6	594	31.6	35.9	12.8	19.7	67.5	32.5	KC476392
	NL 7	594	31.6	35.9	12.8	19.7	67.5	32.5	KC476393
	NL 8	594	31.6	35.9	12.8	19.7	67.5	32.5	KC476394
	NL 9	594	31.6	35.9	12.8	19.7	67.5	32.5	KC476395
白背飞虱 <i>S. furcifera</i>	SF 1	594	29.5	34.1	15.0	21.4	63.6	36.4	KC476378
	SF 2	594	29.5	34.1	15.0	21.4	63.6	36.4	KC476379
	SF 3	594	30.0	34.1	14.5	21.4	64.1	35.9	KC476380
	SF 4	594	30.0	34.1	14.5	21.4	64.1	35.9	KC476381
	SF 5	594	29.5	34.1	15.0	21.4	63.6	36.4	KC476382
	SF 6	594	29.5	34.1	15.0	21.4	63.6	36.4	KC476383
	SF 7	594	29.5	34.1	15.0	21.4	63.6	36.4	KC476384
	SF 8	594	30.0	34.1	14.5	21.4	64.1	35.9	KC476385
	SF 9	594	30.0	34.1	14.5	21.4	64.1	35.9	KC476386
灰飞虱 <i>L. striatellus</i>	LS 1	594	32.2	33.0	13.3	21.5	65.2	34.8	KC476367
	LS 2	594	32.2	32.8	13.3	21.7	65.0	35.0	KC476368
	LS 3	594	32.0	32.7	13.5	21.8	64.7	35.3	KC476369
	LS 4	594	32.2	33.0	13.3	21.5	65.2	34.8	KC476370
	LS 5	594	32.0	32.7	13.5	21.8	64.7	35.3	KC476371
	LS 6	594	32.2	33.0	13.3	21.5	65.2	34.8	KC476372
	LS 7	594	32.0	32.7	13.5	21.8	64.7	35.3	KC476373
	LS 8	594	32.2	33.0	13.3	21.5	65.2	34.8	KC476374
	LS 9	594	32.0	32.7	13.5	21.8	64.7	35.3	KC476375
	LS 10	594	32.0	32.8	13.5	21.7	64.8	35.2	KC476376
	LS 11	594	32.2	33.0	13.3	21.5	65.2	34.8	KC476377

A: Adenine; T: thymine; G: guanine; C: cytosine.

种间:3 种稻飞虱腺嘌呤(A)平均含量为灰飞虱 > 褐飞虱 > 白背飞虱;胸腺嘧啶(T)平均含量为褐飞虱 > 白背飞虱 > 灰飞虱;鸟嘌呤(G)平均含量为白背飞虱 > 灰飞虱 > 褐飞虱;胞嘧啶(C)平均含量为灰飞虱 > 白背飞虱 > 褐飞虱;腺嘌呤与胸腺嘧啶(A+T)之和的平均含量为褐飞虱 > 灰飞虱 > 白背飞虱(表1)。

2.2.2 种内、种间 P 距离值及系统发育树

种内 P 距离值范围:褐飞虱个体间序列组成相同,其值为 0;白背飞虱为 0~0.51%;灰飞虱为 0~

0.51%。种间 P 距离值范围:褐飞虱与灰飞虱间为 29.68%~30.06%;灰飞虱与白背飞虱间为 25.53%~27.22%;白背飞虱与褐飞虱间为 32.96%~34.21%。种间 P 距离值明显高于种内。

邻接法构建 3 种飞虱共 29 个个体的系统发育树,其聚集成三大支,LS1~LS11、SF1~SF9 和 NL1~NL9 各为一支(图 2)。表明种间、种内聚集程度不同,种内明显高于种间,同种的个体均聚在同一个大支。mtCO I 基因符合稻飞虱 DNA 条形码标准,可基于该基因构建 3 种稻飞虱的 DNA 条形码。

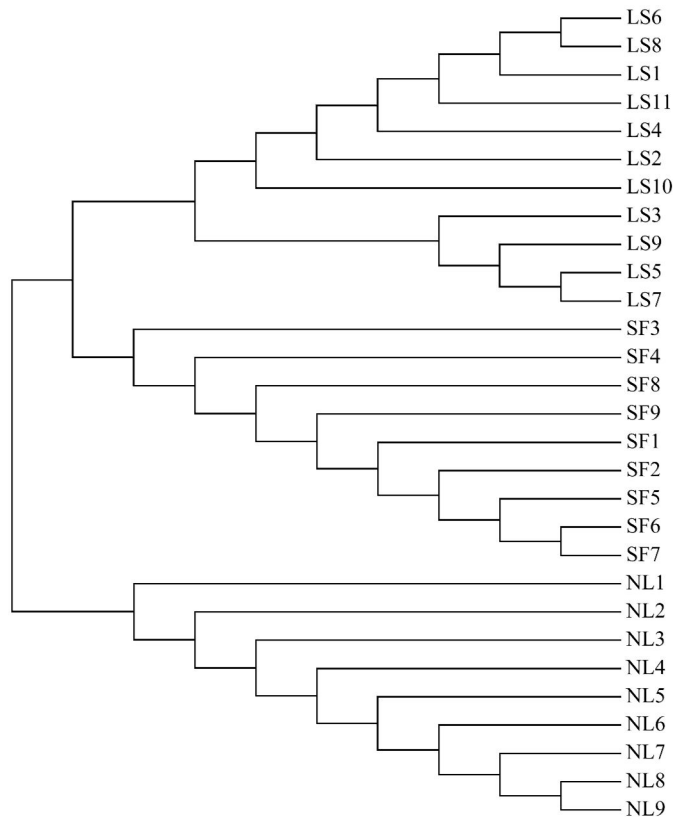


图 2 基于 mtCO I 基因序列构建的 3 种稻飞虱系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of three rice planthoppers based on mtCO I gene sequences

2.3 稻飞虱 DNA 条形码应用

由 X1~X6 供试虫体获得的 mtCO I 基因序列与已上传 NCBI 核酸数据库的 29 条序列进行同源性比对及 P 距离值分析, X1、X5 与样本 SF1、SF2、SF5、SF6、SF7 序列相同, P 距离值为 0, 同源性为 100%; X2、X4 与样本 NL1~NL9 序列相同, P 距离值为 0, 同源性为 100%; X3、X6 与样本 LS1、LS4、LS6、LS8、LS11 序列相同, P 距离值为 0, 同源性为 100%。由此鉴定 X1、X5 为白背飞虱; X2、X4 为褐飞虱; X3、X6 为灰飞虱。表明基于 mtCO I 基因片

段构建的稻飞虱 DNA 条形码能够对稻飞虱若虫及卵进行准确鉴定。

3 讨论

白背飞虱、灰飞虱、褐飞虱成虫虫体可依据葛钟麟等^[12]形态分类方法进行准确鉴定,但其卵、若虫难以通过形态方法予以鉴定。本研究中, mtCO I 基因片段在 3 种稻飞虱的不同虫态间序列变异率很小(0~0.51%),且几乎完全相同,表明依据遗传基因建立的分类方法(DNA 条形码)通用于各虫态的鉴

定,可弥补形态分类的不足。3种稻飞虱种间P距离值明显高于种内。系统发育树显示种内的聚集程度高于种间,同种的个体汇聚在同一分支上,表明mtCOI基因可作为3种稻飞虱的DNA条形码,这与Hebert等^[10]及Ball等^[13]关于mtCOI基因可用作动物DNA条形码的结论一致。杨聪慧等^[14]对夜蛾科DNA条形码的研究表明,种内平均遗传距离为0.03%,种间为11.29%,其种间P距离也明显高于种内,而种间和种内P距离值均低于本研究,说明mtCOI基因在不同类群中变异程度不同,因此利用DNA条形码技术对某一类群鉴定前,需要分析mtCOI基因在该类群中的遗传变异程度,即种内、种间遗传距离变化范围,建立该类群物种DNA条形码并应用。本试验建立了3种稻飞虱DNA条形码,且能成功应用于若虫和卵的鉴定,为飞虱类农业害虫的鉴定提供了新的技术手段,也为飞虱科昆虫的分类研究提供借鉴。

参考文献(References)

- [1] 巫国瑞,胡萃. 稻飞虱. 北京:农业出版社,1987
- [2] 刘天雷,金道超,杨洪,等. 贵州三都一季中稻区褐飞虱主害代的发生规律. 植物保护学报,2013,40(2):133-139
- [3] 赵悦,张孝羲,翟保平. 江西上犹2009、2010年南方水稻黑条矮缩病的毒源地分析. 应用昆虫学报,2011,48(5):1321-1334
- [4] 薛新宇,秦维彩,孙竹,等. N-3型无人直升机施药方式对稻飞虱和稻纵卷叶螟防治效果的影响. 植物保护学报,2013,40(3):273-278
- [5] Dincü V, Zakharov E V, Hebert P D, et al. Complete DNA barcode reference library for a country's butterfly fauna reveals high performance for temperate Europe. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, 2011, 278: 347-355
- [6] Li Q Q, Li D Y, Ye H, et al. Using COI gene sequence to barcode two morphologically alike species: the cotton bollworm and the oriental tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). Molecular Biology Reports, 2011, 38(8): 5107-5113
- [7] Clare E L, Lim B K, Engstrom M D, et al. DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. Molecular Ecology Notes, 2007, 7: 184-190
- [8] Damm S S, Heike B H. An integrative approach to species discovery in odonates: from character-based DNA barcoding to ecology. Molecular Ecology, 2010, 19(18): 3881-3893
- [9] 姜帆,刘佳琪,李志红,等. 基于DNA条形码的广西苦瓜中实蝇幼虫分子鉴定研究. 植物保护,2011,37(4):150-153
- [10] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, 2003, 270: 313-321
- [11] 刘建利. 利用28S rDNA D1/D2区和ITS rDNA序列鉴定甜瓜白粉病病原菌. 植物保护学报,2011,38(1):47-51
- [12] 葛钟麟,丁锦华,田立新,等. 中国经济昆虫志(第27册):同翅目飞虱科. 北京:科学出版社,1984
- [13] Ball S L, Hebert P D N, Burian S K, et al. Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. Journal of the North American Benthological Society, 2005, 24(3): 508-524
- [14] 杨聪慧,韩辉林,迟美妍,等. DNA条形码技术在北京百花山地区夜蛾科物种鉴定中的应用. 昆虫学报,2012,55(9):1082-1092

(责任编辑:高峰)