

分子生物学鉴定印度进口花生中的花生豆象的探究

伦才智¹, 陈伟¹, 张京宣², 杨娟¹, 王勇¹, 叶保华^{3*}

(1. 临沂出入境检验检疫局综合技术服务中心, 临沂 276034; 2. 青岛海关, 青岛 266002;
3. 山东农业大学植保学院, 泰安 271018)

摘要: 目的 探究以分子生物学技术和系统进化学手段鉴定具有完整生命周期的花生豆象(印度)的方法。**方法** 对花生豆象线粒体细胞色素C氧化酶亚基I(COI)基因进行PCR扩增, 获得COI基因序列, 再利用最大简约法(maximum parsimony, MP)构建花生豆象与其他14种豆象基于COI基因片段序列的分子系统进化树, 分析亲缘进化关系。**结果** 通过GenBank BLAST证明所得序列为花生豆象的COI基因序列, 由GenBank获得登录号。根据系统进化树得出同一地区的四纹豆象和花生豆象亲缘关系较近。**结论** 本研究为采用分子生物学检疫鉴定进境花生豆象奠定了基础。

关键词: 花生豆象; 生命周期; 细胞色素C氧化酶亚基I; PCR; 系统进化

Preliminary exploration of identifying *Caryedon serratus* (Olivier) in peanuts from India by molecular biology techniques and systems

LUN Cai-Zhi¹, CHEN Wei¹, ZHANG Jing-Xuan², YANG Juan¹, WANG Yong¹, YE Bao-Hua^{3*}

(1. Comprehensive Technology Center of Linyi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Linyi 276034, China;
2. Qingdao Customs, Qingdao 266002, China; 3. School of Stored Product Insects and Resource Insects, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

ABSTRACT: Objective To explore the methods for the identification of *Caryedon serratus* (Olivier) in peanuts with a complete life cycle from India by molecular biology techniques and systems. **Methods** The mitochondria cytochrome C oxidase I (COI) gene of *Caryedon serratus* mitochondria was amplified by PCR, and the COI gene sequence was obtained. Then the phylogenetic tree of *Caryedon serratus* and 14 kinds of other bean weevils based on COI gene fragment sequence was constructed by maximum parsimony (MP) method, and the phylogenetic relationship was analyzed. **Results** The sequence was confirmed as COI gene of *Caryedon serratus* by GenBank BLAST, and submitted to GenBank for a login number. The phylogenetic tree showed that *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) and *Caryedon serratus* in the same area had a close phylogenetic relationship. **Conclusion** This study lays a foundation for the use of molecular biology techniques and systems to identify *Caryedon serratus* (Olivier) in imported peanuts.

KEY WORDS: *Caryedon serratus*; life cycle; cytochrome C oxidase I; PCR; phylogeny

基金项目: 原山东出入境检验检疫局科计项目(SK201717)、原国家质检总局科技项目(2016IK194)

Fund: Supported by Shandong Inspection and Quarantine Bureau Scientific Plan (SK201717) and National Bureau of Quality Inspection Scientific Plan (2016IK194)

*通讯作者: 叶保华, 教授, 主要研究方向为储藏物昆虫、资源昆虫等。E-mail: baohua@sdau.edu.cn

*Corresponding author: YE Bao-Hua, Professor, School of Stored Product Insects and Resource Insects, Shandong Agricultural University, No.61, Daizong Street, Taian 271018, China. E-mail: baohua@sdau.edu.cn

1 引言

2012 年,原临沂出入境检验检疫局首次在印度进口花生中截获了大量具有完整生命周期(含卵、幼虫、蛹、成虫)的花生豆象,因花生豆象的危害很大,造成了进口花生退运。花生豆象 *Caryedon serratus* (Olivier), 隶属豆象科 Bruchidae, 豆象亚科 Bruchinae, 瘤背豆象属 *Callosobruchus*。花生豆象作为该属重要的仓储害虫,1992 年曾被列入《中华人民共和国植物检疫危险性病、虫、杂草名录》。但 2007 年颁布的《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》未包括花生豆象,原因可能是该虫已在我国云南等地发生^[1]。但由于花生豆象的严重危害和潜在威胁,日本、韩国、乌克兰等仍把花生豆象列为检疫对象,因此建议将其增补到中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录中^[2]。目前对检疫截获豆象类昆虫的鉴定工作存在较大困难,特别是幼虫需通过分子生物学分类技术的研究。线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I (COI) 为主要标记基因的 DNA 条形码技术^[3],利用 COI 基因 5' 端的碱基序列作为标记来实现物种的快速、准确鉴定与分类^[4]。国内还未将此技术用于花生豆象的鉴定。本研究利用 COI 基因 DNA 条形码技术扩增花生豆象 COI 基因序列,提交源性 DNA、特异性引物和该虫态的具体序列,建立与其他 14 种豆象基于 COI 基因片段序列的分子系统进化树,为豆象分子鉴定研究提供借鉴。其他研究尚未发现此项研究报道。本研究运用分子生物学方法对印度进口花生中花生豆象线粒体 COI 基因进行探索研究,得到花生豆象 COI 基因序列,建立豆象的分子系统进化树,明确进境豆象与国内种间的亲缘关系和真实进化距离,为其他进境豆象提供鉴定依据,并以此进行豆象种类鉴定,为解决检疫上重要有害生物的准确鉴定提供了强有力的技术支撑,对维护我国内外贸易都具有重要的意义。

2 材料与方法

2.1 材料及主要试剂

2012 年,原临沂出入境检验检疫局首次在印度进口花生中截获了大量花生豆象的卵、幼虫、蛹、成虫,本研究将截获到的花生豆象成虫用 99% 乙醇清洗干净后放到 -80°C 超低温冰箱保存。

线粒体 DNA 提取试剂盒(北京索莱宝科技有限公司); Taq DNA Polymerase 酶、deoxy-ribonucleoside triphosphates (dNTPs) (天根生化科技(北京)有限公司); RNAiso Plus、PMD 18-T Vector Takara、DNA 片段回收纯试剂盒(上海生物工程技术有限公司); 长链高保真 PCR 酶(宝生物工程大连有限公司); SMART MMLV 反转录酶、PCR 引物(宝生物工程(上海)有限公司)。

2.2 花生豆象完整生命周期的鉴定特征

花生豆象卵、幼虫、蛹、成虫的形态如图 1 所示。



注: a: 卵; b: 幼虫; c: 蛹; d: 成虫。

图 1 花生豆象完整生命周期形态

Fig.1 Morphology of the whole life cycle of *Caryedon serratus* (Olivier)

卵: 长约 1 mm, 椭圆形, 明显大于常见的豆象卵。卵外壳有明显暗色格状网纹^[5]。

幼虫: 老熟幼虫长 4~6 mm, 黄褐色, 肥胖, 弯曲略呈“C”形。足退化^[6]。

蛹: 长 5~6 mm, 椭圆形, 初为乳白色, 渐变为黄棕色^[7]。

成虫: 体长 3.5~6.8 mm, 宽 1.8~3.0 mm, 体棕褐色, 鞘翅上有明显暗色斑。前胸背板中区无暗色纵纹。触角第 5~10 节向一侧扩展呈锯齿状。复眼大而突出, 复眼前缘有轻微凹陷, 触角红棕色, 鞘翅长约为宽的 1.5 倍, 小盾片矩形, 鞘翅末端圆形不遮住臀板。后足腿节发达^[8]; 腹面中央有一大齿, 向端部方向跟随 8~12 个小齿。雄性外生殖器的外阳茎腹瓣端部不分裂^[9], 内阳茎有大的骨化刺 4 对, 其中 1 对呈牛角状, 另 1 对强烈弯曲^[5]。

2.3 豆象线粒体 DNA 的提取及 PCR 扩增

取 2.1 材料中的花生豆象成虫, 参照文献^[10]的方法提取线粒体 DNA。目的片段扩增使用引物序列为: 5'-GGAGGATTTGGAAAATTGATTAGTTCC-3' (f) 5'-CCCGGTAAAATTTAAAATATAAACTTC-3' (r)。PCR 反应体系 (25 μL): 模板 DNA 2 μL , 10 \times PCR buffer: 2.5 μL , D-NTP: 1 μL , 引物 f: 1 μL , 引物 r: 1 μL , 酶: 0.5 μL , 无菌水: 17 μL 。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 50 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 以上步骤从 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性起进行 40 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。反应结束后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 产物的检测方法^[6]: 取 PCR 产物 15 μL , 点样到 0.8% 琼脂糖凝胶测定电泳, 然后于 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Ethidium Bromide (EB) 中染色 10 min, 在凝胶成像仪中观察照胶成像, 再于长波紫外灯下切取目的条带。使用快捷型琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 II (DPI721) 进行纯化回收, 测序^[11]。

2.4 数据分析

利用 MEGA5.5 将克隆得到的花生豆象 COI 基因片段序列及 BLAST 搜索得到的其他昆虫样品 COI 基因序列对齐。为了便于数据分析, 以花生豆象样本 COI 基因序列长度为标准, 剪掉其他分析样本序列的多余序列后, 对基因片段序列碱基组成和结构采用 DNAMAN 6.0 软件进行分析, 利用 MEGA 5.5 软件分析各物种 COI 基因的碱基变异和遗传距离, 并用邻接法和最大简约法, 构建花生豆象与其他 14 种昆虫基于 COI 基因片段序列的系统发生树^[11]。

3 结果与分析

3.1 花生豆象 PCR 扩增

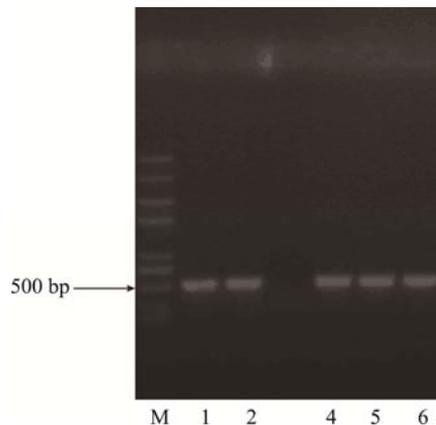
按照 2.3 方法进行 PCR 反应, PCR 产物用 0.8% 琼脂糖电泳检测, 结果如图 2。PCR 产物为 500 bp 左右, 且产物条带单一, 大小与预测大小基本一致, 因此可以初步判断得到花生豆象 COI 基因序列。

3.2 测序及序列提交

经宝生物工程(上海)有限公司测序, 得到花生豆象 COI 基因如下:

以引物对花生豆象基因进行 PCR 扩增, 样本的扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 条带大小均在 500 bp 左右(图 2), 与预期结果相符。回收、纯化后测序, 将两端引物序列的不稳定序列剪切掉, 得到 481 bp 的 COI 基因片段。

该片段序列在 GenBank 进行 BLAST 搜索, 结果同登录号 KP331465 的 *Caryedon serratus* 的 COI 基因相似度极高, 证明所得序列为花生豆象的 COI 基因片段序列。将花生豆象样本的序列提交到 GenBank, 获得登录号 KX011461。



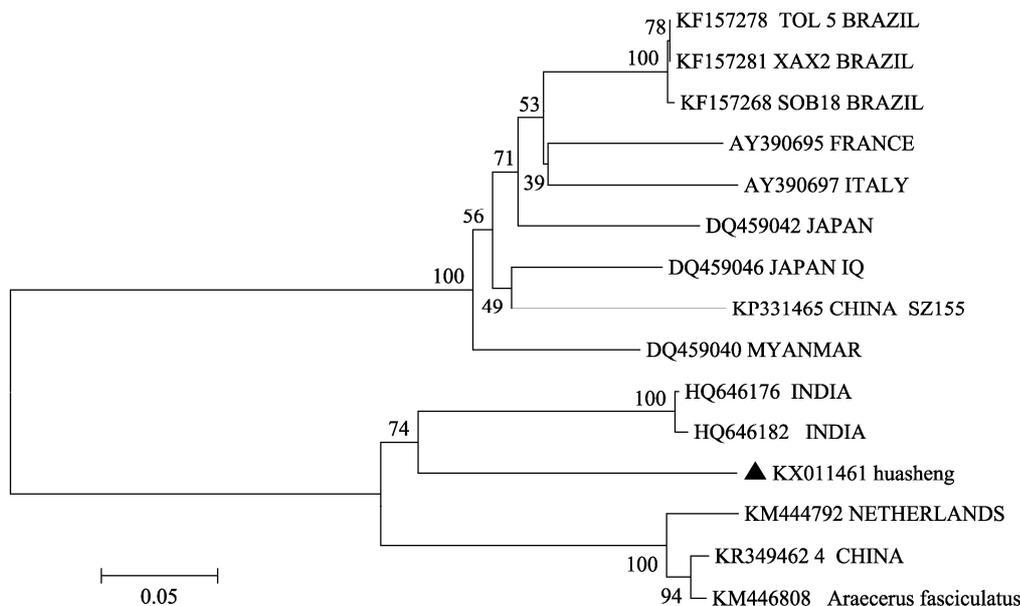
注: M: Trans2K Plus DNA Marker; 1~2、4~6: 花生豆象样品; CK: 阴性对照。

图 2 花生豆象 COI 基因序列 PCR 扩增电泳结果

Fig.2 The PCR and electrophoresis result of *Caryedon serratus* (Olivier) COI gene sequence

3.3 花生豆象及其他 14 种昆虫的 COI 基因序列系统进化分析

利用 MP 法构建花生豆象与其他 14 种豆象基于 COI 基因片段序列的分子系统进化树(图 3), 分子系统进化树



注: KF157281 XAX2 菜豆象(巴西); KF157278 TOL5 菜豆象(巴西); KF157268 SOB 18 菜豆象(巴西); AY390695 蚕豆象(法国); AY390697 兵豆象(意大利); DQ459042 灰豆象(日本); DQ459046 四纹豆象(日本); KP331465 花生豆象(中国); DQ459040 鹰嘴豆象(缅甸); HQ646176 四纹豆象 (印度); HQ646182 四纹豆象 (印度); KM444792 咖啡豆象(荷兰); KM446808 咖啡豆象(新西兰); KQ349462 咖啡豆象(中国); 节点数字表示 1000 次自检验的置信度。

图 3 花生豆象与其他 14 种豆象基于 COI 基因片段序列的分子系统进化树

Fig.3 The phylogenetic tree based on COI gene sequence of *Caryedon serratus* (Olivier) and 14 other bean weevil species

有 2 个明显分支: 瘤背豆象属的昆虫聚集在一起形成 1 个分支; 长角豆象属的昆虫聚集在一起形成另 1 个分支。在前一分支里, 瘤背豆象科的每个豆象种类之间的亲缘关系都小于 85, 没有表现出极相似的亲缘关系。在后一个分支里, 长角象科的昆虫聚在一起形成一簇, 四纹豆象和花生豆象(印度)单独形成一个亚支, 说明印度的四纹豆象和花生豆象进化关系较近。由此可见, 利用不同单基因来分析进化关系时, 会产生矛盾的结论, 需要参考多方面因素进行综合考虑^[12]。

4 结论与讨论

研究表明, 利用 DNA 条形码鉴定的物种 63.7% 的序列都来自昆虫纲^[13], 其中研究较多的是鳞翅目^[4], 其次为双翅目^[14]、鞘翅目^[15], Herbert 等^[16]对昆虫线粒体基因序列进行分析, 发现同属各种的 COI 基因序列的平均差异程度为 11.3%, 而种内的序列差异程度低于 2%。本研究表明, 绝大多数昆虫能够根据 COI 基因片段区分开^[17]。与传统进化关系不同的是, 本研究中花生豆象和四纹豆象没有与其他国家的瘤背豆象属的物种在 1 个分支上, 原因可能是研究中使用的 COI 基因片段涵盖的信息尚不完整, 因此用 COI 基因片段作为标记的 DNA 条形码分析物种系统进化关系还存在一定的缺陷, 导致二者与长角象科的昆虫聚在了 1 个大分支里。但本研究对印度花生豆象的 COI 基因扩增得到 COI 基因序列, 对口岸建立重要危害性豆象包括检疫性豆象的特征性基因库提供了最新数据, 为口岸采用分子检测技术鉴定非中国种类豆象提供借鉴。

参考文献

- [1] 邓福珍, 朱冠, 张群, 等. 罗望子象和花生豆象发生规律及生物学特性[J]. 植物检疫, 1993, 7(6): 422-424.
Deng FZ, Zhu G, Zhang Q, et al. The occurrence law and biological characteristic of *Sitophilus alandri* (Linearis) and *Caryedon serratus* (Olivier) [J]. Plant Quarant, 1993, 7(6): 422-424.
- [2] 李猷, 郭建军, 季英超, 等. 花生豆象的潜在威胁和检疫地位[J]. 生物安全学报, 2013, 22(2): 86-90.
Li Y, Guo JJ, Ji YC, et al. Potential threat and quarantine status of the groundnut beetle *Caryedon serratus* (Coleoptera: Chrysomelidae) in China [J]. J Biosaf, 2013, 22(2): 86-90.
- [3] 杨倩倩, 李志红, 伍祎, 等. 线粒体 COI 基因在昆虫 DNA 条形码中的应用[J]. 应用昆虫学报, 2012, 49(6): 1687-1695.
Yang QQ, Li ZH, Wu Y, et al. Advance and application of mtDNA COI barcodes on insects [J]. Chin Bull Entomol, 2012, 49(6): 1687-1695.
- [4] 李青青, 李地艳, 段焰青, 等. DNA 条形码在鳞翅目昆虫中的应用[J]. 生命科学, 2010, 2(4): 307-312.
Li QQ, Li DY, Duan YQ, et al. Application of DNA barcoding in lepidopteran insects [J]. Chin Bull Life Sci, 2010, 2(4): 307-312.
- [5] 张生芳, 刘永平, 武增强, 等. 中国储藏物甲虫[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
Zhang SF, Liu YP, Wu ZQ, et al. China storage beetles [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1998.
- [6] 张生芳. 花生豆象[J]. 植物检疫, 1992, (4): 24-26.

- Zhang SF. *Caryedon serratus* (Olivier) [J]. Plant Quarant, 1992, (4): 24-26.
- [7] 张生芳, 陈洪俊, 薛光华, 等. 储藏物甲虫彩色图鉴[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2008.
Zhang SF, Chen HJ, Xue GH, et al. Storage beetles color map [M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2008.
- [8] 杨永茂, 叶向勇, 李玉亮, 等. 瘤背豆象属 4 种检疫性害虫及其防治[J]. 山东农业科学, 2004, (3): 54-56.
Yang YM, Ye XY, Li YL, et al. 4 kinds of quarantine pests of *Callosobruchus* and its prevention [J]. Shandong Agric Sci, 2004, (3): 54-56.
- [9] 杨永茂, 叶向勇, 李玉亮, 等. 瘤背豆象属 6 种检疫性害虫概述[J]. 植物检疫, 2004, 18(3): 153-155.
Yang YM, Ye XY, Li YL, et al. A survey on 6 kinds of quarantine pests of *Callosobruchus* [J]. Plant Quarant, 2004, 18(3): 153-155.
- [10] 杨瑞生, 姜义仁, 石生林, 等. 橡实象虫及其近缘种基于线粒体 DNA COII 基因的分子系统学研究[J]. 蚕业科学, 2010, 36(4): 577-583.
Yang RS, Jiang YR, Shi SL, et al. Molecular systematics of acorn weevil and its allied species based on COII gene of mitochondrial DNA [J]. Sci Sericult, 2010, 36(4): 577-583.
- [11] 杨瑞生, 钟亮, 姜义仁, 等. 橡实象虫等 25 种昆虫线粒体 COI 基因的遗传多样性及系统进化分析[J]. 蚕业科学, 2011, 37(6): 985-992.
Yang RS, Zhong L, Jiang YR, et al. Genetic diversity and phylogenetic analysis of COI genes from *Curculio arakawai* weevil and 24 other insect species [J]. Sci Sericult, 2011, 37(6): 985-992.
- [12] 吴培福, 佟友贵, 王琳, 等. 2 种豆象线粒体 COX1 和 12S rRNA 基因序列的克隆分析[J]. 西南林业大学学报, 2014, 34(2): 44-48.
Wu PF, Tong YG, Wang L, et al. Cloning and sequence analysis on COX1 and 12S rRNA genes of two seed beetle species [J]. J Southwest Forest Univ, 2014, 34(2): 44-48.
- [13] 隋建中, 热依汗古丽, 马德成. 加强对检疫性害虫-四纹豆象的检疫[J]. 新疆农业科学, 2001, 38(5): 272.
Sui JZ, Re YHGL, Ma DC. Strengthening the quarantine of *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) [J]. Xinjiang Agric Sci, 2001, 38(5): 272.
- [14] Nelson LA, Wallman JF, Dowton M. Using COI barcodes to identify forensically and medically important blowflies [J]. Med Vet Entomol, 2007, 21(1): 44-52.
- [15] Monaghan MT, Balke M, Gregory TR, et al. DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers [J]. Proc R Soc Lond Ser B, 2005, 360(1462): 1925-1933.
- [16] Hebert PDN, Cywinska A, Ball S, et al. Biological identifications through DNA barcodes [J]. Proc R Soc Lond Ser B, 2003, 270(1512): 313-321.
- [17] 陈占秀, 顾耘. 线粒体 COI 基因在同翅目蚜科昆虫种类鉴定中的应用研究[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版), 2012, 29(4): 261-266.
Chen ZX, Gu Y. Study on application of COI gene in the homoptera aphididae [J]. J Qingdao Agric Univ (Nat Sci), 2012, 29(4): 261-266.

(责任编辑: 苏笑芳)

作者简介



伦才智, 硕士, 农艺师, 主要研究方向为植物检疫有害生物。
E-mail: allen0522@163.com



叶保华, 教授, 主要研究方向为储藏物昆虫、资源昆虫等。
E-mail: baohua@sda.edu.cn