

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2012.02.015

米尔顿姬小蜂线粒体 16S rRNA 与 COI 基因片段序列测定及分析

黄蓬英^{1*}, 林玲玲¹, 洪钦阳², 廖富荣¹

¹ 厦门出入境检验检疫局, 福建 厦门 361026; ² 福建农林大学植物保护学院, 福建 福州 350002

摘要:【背景】米尔顿姬小蜂是一种入侵我国台湾地区的植食性小蜂,能够严重影响水果的产量和食用价值。目前在我国大陆没有分布,由于其个体微小,与近似种区别较小,通过传统的形态学分类方法难以鉴定,因此有必要研究其基因片段序列,探讨分子鉴定方法。【方法】利用 PCR 方法扩增并测定了米尔顿姬小蜂线粒体 16S rRNA 和 COI 基因的部分序列,并对各序列的碱基组成进行了分析。然后根据 COI 基因部分序列,利用 DNAMAN 的 Maximum Likelihood 方法构建了米尔顿姬小蜂与膜翅目其他科的系统发育树。【结果】16S rRNA 基因的 PCR 扩增产物为 426 bp, COI 基因的 PCR 扩增产物为 488 bp。通过测序获得米尔顿姬小蜂 16S rRNA 和 COI 基因部分序列,序列分析表明, 16S rRNA 和 COI 基因的 A + T 含量均较高,存在较强的 A + T 偏向性。系统发育树显示,米尔顿姬小蜂与蚜小蜂科的 *Encarsia berlesei* 亲缘关系最近,与姬小蜂科的 *Chrysocharis nautilus*、*C. eurynota* 亲缘关系较远。【结论与意义】本研究为米尔顿姬小蜂的分子鉴定提供了依据。

关键词: 米尔顿姬小蜂; 16S rRNA 基因; COI 基因; 序列分析; 分子鉴定

Amplification and sequence analysis of mitochondrial 16S ribosomal RNA and cytochrome oxidase I genes from the invasive *Anselmella miltoni* (Hymenoptera)

Peng-ying HUANG^{1*}, Ling-ling LIN¹, Qin-yang HONG², Fu-rong LIAO¹

¹ Xiamen Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Xiamen, Fujian 361026, China; ² College of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China

Abstract: 【Background】*Anselmella miltoni* Girault is a newly invasive phytophagous wasp in Taiwan, China, so far not detected on the Chinese mainland. The species is difficult to identify because this wasp is tiny and similar to other species of Hymenoptera. Studies on gene sequence with PCR may provide a useful identification tool. 【Method】Partial sequences of the mitochondrial 16S ribosomal RNA (rRNA) and cytochrome oxidase I (COI) genes in *A. miltoni* were amplified and sequenced by using a polymerase chain reaction and DNA sequencing methods. A phylogenetic tree was built by using DNAMAN Maximum Likelihood method based on the COI partial sequences. 【Result】Mitochondrial 16S rRNA and COI PCR products were 426 bp and 488 bp in length, respectively. The sequence analysis results showed that A + T base composition in both 16S rRNA and COI gene sequences were higher than C + G. The phylogenetic tree indicated that the kinship between *A. miltoni* and *Encarsia berlesei* were the most closely, the relationship between *A. miltoni* and *Chrysocharis nautilus*, *C. eurynota* were relatively distant. 【Conclusion and significance】This study identified a possible avenue for the molecular identification of *A. miltoni*.

Key words: *Anselmella miltoni*; 16S ribosomal RNA gene; COI gene; sequence analysis; molecular identification

米尔顿姬小蜂 *Anselmella miltoni* Girault, 属膜翅目 Hymenoptera 小蜂总科 Chalcidoidea 姬小蜂科 Eulophidae *Anselmella* 属,最早仅分布于澳大利亚,现已扩散至我国台湾地区。其幼虫以取食蒲桃属 *Syzygium* 的种子为生,严重影响水果的产量和食用价值(黄蓬英等,2008)。2007、2009 年厦门检验检疫局对来自台湾的莲雾 *Eugenia javanica* Lam 实施检疫时发现该虫。目前,有关米尔顿姬小蜂的研究较少,尤对其生物学、种群遗传等特性缺乏深入的研究。

昆虫的线粒体基因(mtDNA)大小一般为 15.4~16.3 kb。16S rRNA 是 mtDNA 上进化速率中等的基因,其序列高度保守,常被用于高级分类阶元的系统进化和分类鉴定(黄华平等,2006;龙健和庞虹,2003;苏成勇等,2007)。线粒体细胞色素氧化酶第 I 亚基(cytochrome oxidase subunit I, COI)是保守性中等的基因区段,目前已被广泛用于昆虫种间、尤其是种内的遗传变异研究(窦向梅等,2005)。以上述 2 个基因片段序列作为 DNA 条形码,已成为生物分类领域的研究热点。迄今为止,有关米尔顿姬小蜂线粒体 16S rRNA 和 COI 基因序列尚未见报道。本研究通过 PCR 扩增,测定 16S rRNA 和 COI 部分序列,并对其进行分析,以期作为米尔顿姬小蜂的分子鉴定提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验所用虫样为厦门检验检疫局从台湾莲雾上截获的米尔顿姬小蜂成虫。标本浸泡在无水乙醇中, -70℃ 保存。取米尔顿姬小蜂成虫 5 头于双蒸水中漂洗,用吸水纸吸干备用。

1.2 主要生化试剂和仪器

基因组 DNA 提取试剂盒 Universal Genomic DNA Extraction Kit、dNTP Mixture ($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 购自 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司; Dream Taq™ DNA Polymerase ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)、 $10 \times$ Dream Taq™ Buffer(含 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MgCl}_2$) 购自 Fermentas 公司; 100 bp DNA Ladder 购自天根生化科技(北京)有限公司; PCR 引物合成、克隆及测序委托上海生工生物工程公司完成; PCR 仪为 ABI 公司的 Applied Biosystems Thermal Cycler Veriti 96 Well。

1.3 总 DNA 的提取

基因组 DNA 提取参照试剂盒说明书(TaKaRa, Kit Ver. 3.0)的方法。

1.4 PCR 扩增及电泳

16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增引物参考 Szalanski *et al.* (2008), 上游引物为 LR-J-13007 (5'-TTACGCTGTTATCCCTAA-3'), 下游引物为 LR-N-13398 (5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'); COI 基因序列的扩增引物参考 Kolesik *et al.* (2009), 上游引物为 COIs (5'-GGATCACCTGATATAGCATTCCC-3'), 下游引物为 COIa (5'-CCCGGTAAATTTAAATATAAACTTC-3')。

PCR 反应的总体积为 $50 \mu\text{L}$, 其中包括 $10 \times$ Dream Taq™ Buffer(含 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MgCl}_2$) $5 \mu\text{L}$, dNTP Mixture ($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) $4 \mu\text{L}$, 上、下游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 $2 \mu\text{L}$, Dream Taq™ DNA Polymerase ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $0.25 \mu\text{L}$, 模板 DNA $4 \mu\text{L}$, 加灭菌双蒸水至终体积。

PCR 反应程序: 95°C 预变性 3 min; 94°C 变性 45 s, 53°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72°C 延伸 7 min。

1.5 克隆测序与序列分析

将 PCR 产物回收纯化后进行克隆及测序。将获得的 DNA 序列通过 NCBI 进行 BLAST 相似性检索, 经人工核对后确认所得的序列片段, 然后用 DNAMAN 和 DNAClub 软件对序列进行剪裁与分析。

从 GenBank 上下载姬小蜂科的 *Chrysocharis nautilus* (Walker) (GenBank 登录号: HM573784)、*C. eurynota* Graham (GenBank 登录号: HM573749), 蚜小蜂科的 *Encarsia berlesei* (Howard) (GenBank 登录号: GQ922199), 赤眼蜂科的 *Trichogramma nmwanzai* Schulten (GenBank 登录号: DQ177920)、*T. brasiliensis* Ashmead (GenBank 登录号: DQ177919), 金小蜂科的 *Pteromalus* sp. (GenBank 登录号: HM574095)、*Nasonia longicornis* Darling (GenBank 登录号: GQ336371) 的序列进行比较, 并采用 DNAMAN 上的 Maximum Likelihood 方法绘制系统发育树。

2 结果与分析

2.1 米尔顿姬小蜂 16S rRNA 和 COI PCR 扩增

利用 2 对通用引物对米尔顿姬小蜂进行 PCR 扩增。引物 LR-J-13007/LR-N-13398 扩增到 16S rRNA 约 420 bp 的条带; 引物 COIs/COIa 扩增到 COI 基因约 490 bp 的条带(图 1)。

2.2 序列分析

2.2.1 米尔顿姬小蜂 16S rRNA 序列分析 克隆测序结果表明, 米尔顿姬小蜂 16S rRNA 基因序列为 426 bp(图 2)。同源性比较发现, 该序列与数据库中部分物种的序列有很高的同源性, 因而确定克隆片段为 16S rRNA 基因部分序列。A、T、C、G 平均含量分别为 175 bp (41.10%)、182 bp (42.70%)、39 bp (9.20%)、30 bp (7.00%), 且 A + T 含量 (83.80%) 大于 G + C 含量 (16.20%)。

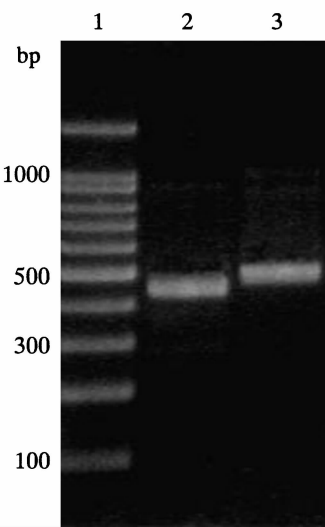


图 1 米尔顿姬小蜂 16S rRNA 和 COI 基因的 PCR 扩增产物
Fig.1 PCR amplification products of 16S rRNA and COI genes in *A. miltoni*
1: 100 bp DNA 标准分子质量; 2: 引物 LR-J-13007/LR-N-13398;
3: 引物 COIs/COIa。
1: 100 bp DNA marker; 2: LR-J-13007/LR-N-13398 primer;
3: COIs/COIa primer.

```
1      TTACGCTGTT ATCCCTAAGG TAATTAAATT TAATTTTAAAT AATATTACAT TTATAGTATA
61     TATATATATA TATATATATT ATAATTAATT AATTTAAAAA ATTTATTAAA TTTTATTTATC
121    ACCCCAATAA AATATAATTT AATTATATTT TACATTTTATT ATATAAAAATA AATAATTATA
181    TAAAAATTCTA TAGGGTCTTC TCGTCTTTCA AAAATTTTTA AGAATTTTATA CTTAAAAATAA
241    AATTTAATTA TTATTATATT TGAGACAGTA TTTATTTTCAT TAAATCATTG ATACTAGACT
301    TTAATAAAAA GACAAATGAT TATGCTACCT TTGTACAGTT AAAATATTGC AGCTATTTAA
361    ATAAATTCAT TGAGCAGATT TGATTTTAAA TTATAATCTA AAAACCATGT TTTTGATAAA
421    CAGGCG
```

图 2 米尔顿姬小蜂 16S rRNA 基因部分序列

Fig.2 16S rRNA partial sequences in *A. miltoni*

```
1      GGATCACCTG ATATAGCATT CCCTCGAATA AATAATATAA GATTTTGATT ATTACACCCT
61     AGACTTATTT TATTAATTAA TAGACTATTT ATTGGTTCTG GTACAGGAAC TGGATGAACA
121    GTTTATCCTC CTTTATCTTC TAATCTTAGA CATAGGAGAC CTTTCAGTAGA TACGTGTATA
181    TCAATTTTTT CTTTACATAT TGCAGGGGTT TCTTCTATTA TAGCTTCGAT TTATTTTATT
241    TCTACTATTT TAAATATAAA AATTTATAAG ATTGAGATTA TCCCTTTTATT TGCTTGAGCA
301    ATATTATTAA CTGCAATTTT ATTATTATTA TCTTTACCAG TATTGGCTGG AGCTATTACT
361    ATATTATTAT TTGATCGAAA TTTAAATACT TCATTTTTTT ATCCTTCTGG AGGAGGAGAT
421    CCAATTTTAT ATCAACATTT ATTTTGATTT TTCGATCACC CAGAAGTTTA TATTTTAATT
481    TTACCGGG
```

图 3 米尔顿姬小蜂 COI 基因部分序列

Fig.3 COI partial sequences in *A. miltoni*

3 结论与讨论

本研究测定了米尔顿姬小蜂线粒体 16S rRNA 和 COI 基因的部分序列,并分析了相应序列的碱基组成特征。结果表明,其 16S rRNA 和 COI 基因的 A + T 含量分别为 83.80% 和 72.75%,均明显高于 C + G 含量。该结果与其他昆虫的 16S rRNA 和 COI 基因研究结果(谭宏伟等,2009; 赵惠玲等,2010; 郑福山等,2007)相符,即存在较强的 A + T 偏好性,这与昆虫线粒体基因的碱基组成特征基本一致。

2.2.2 米尔顿姬小蜂 COI 序列分析 克隆测序结果表明,米尔顿姬小蜂 COI 基因序列为 488 bp (图 3)。同源性比较发现,该序列与数据库中部分物种的序列有很高的同源性,因而确定克隆片段为 COI 基因部分序列。A、T、C、G 平均含量分别为 144 bp (29.51%)、211 bp (43.24%)、70 bp (14.34%)、63 bp (12.91%),且 A + T 含量(72.75%)大于 G + C 含量(27.25%)。

2.2.3 基于 COI 部分序列构建的系统发育树 根据 COI 部分序列,利用 DNAMAN 的 Maximum Likelihood 方法构建的系统发育树如图 4。米尔顿姬小蜂与蚜小蜂科的 *E. berlesei* 亲缘关系最近,与姬小蜂科的 *C. nautius*、*C. eurynota* 亲缘关系较远。而按照形态学分类,米尔顿姬小蜂应与后者亲缘关系较近。这可能与米尔顿姬小蜂是植食性小蜂,而其他种类是寄生蜂有关。

根据 COI 部分序列构建的系统发育树表明,米尔顿姬小蜂与蚜小蜂科的 *E. berlesei* 亲缘关系最近,与姬小蜂科的 *C. nautius*、*C. eurynota* 亲缘关系较远。

本研究获得了米尔顿姬小蜂线粒体 16S rDNA 和 COI 基因的部分序列,为今后米尔顿姬小蜂的分子鉴定及系统发育研究等奠定了基础。基于 COI 基因的条码技术已广泛应用于昆虫的分子鉴定,因此,设计米尔顿姬小蜂特异引物进行分子鉴定是下

一步的工作重点。此外,米尔顿姬小蜂已入侵我国台湾地区,随着台湾水果进口量的不断增多,我国大陆也存在米尔顿姬小蜂大量入侵的风险,因此应引起有关部门的高度重视。

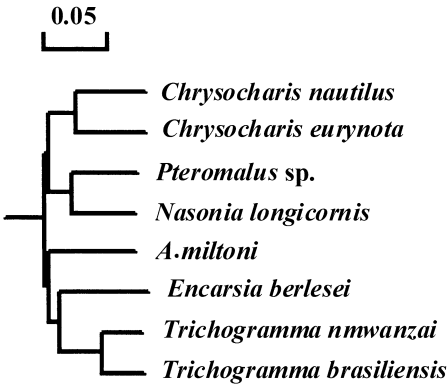


图 4 运用 DNAMAN Maximum Likelihood 方法
基于 COI 部分序列构建的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree inferred from COI partial sequences
using the DNAMAN Maximum Likelihood method

参考文献

窦向梅, 肖晖, 黄大卫. 2005. 基因序列在小蜂总科分子系统发育研究中的应用. 动物分类学报, 30(1): 29 – 34.

黄华平, 杨腊英, 王国芬. 2006. rDNA 和 mtDNA 在昆虫系统发育与区系研究中的应用. 华南热带农业大学学报, 12(4): 45 – 49.

黄蓬英, 林玲玲, 叶正青, 徐梅, 吴媛. 2008. 台湾莲雾上截获的米尔顿姬小蜂. 植物检疫, 22(3): 178 – 179.

龙健, 庞虹. 2003. 瓢虫的 16S rDNA 序列扩增. 贵州师范大学学报: 自然科学版, 21(2): 52 – 54.

苏成勇, 朱国萍, 郝家胜. 2007. 凤蝶亚科(凤蝶科, 鳞翅目)16S rRNA 基因的分子系统发生分析. 动物分类学报, 32(2): 335 – 342.

谭宏伟, 董霞, 和绍禹. 2009. 云南省东方蜜蜂线粒体 16S rRNA 基因的扩增及序列分析. 云南农业大学学报, 24(3): 403 – 407.

赵惠玲, 张虎芳, 杨慧妮. 2010. 蜡亚科部分昆虫 mtDNA 16S rRNA 序列多态性分析(半翅目: 蜡科). 太原师范学院学报: 自然科学版, 9(4): 134 – 138.

郑福山, 杜予州, 王志杰, 王莉萍. 2007. 基于线粒体 COI 基因序列的小莹叶甲属部分种类分子系统学研究(鞘翅目: 叶甲科: 莹叶甲亚科). 昆虫学报, 50(5): 501 – 507.

Kolesik P, Rice A D, Bellis G A and Wirthensohn M G. 2009. *Procontarinia pustulata*, a new gall midge species (Diptera: Cecidomyiidae) feeding on mango, *Mangifera indica* (Anacardiaceae), in northern Australia and Papua New Guinea. *Australian Journal of Entomology*, 48: 310 – 316.

Szalanski A L, Austin J W, McKern J A, Steelman C D and Gold R E. 2008. Mitochondrial and ribosomal internal transcribed spacer 1 diversity of *Cimex lectularius* (Hemiptera: Cimicidae). *Journal of Medical Entomology*, 45: 229 – 236.

(责任编辑: 杨郁霞)