

入侵害虫西花蓟马及其他 8 种常见蓟马的分子鉴定

游中华^{1,2}, 路虹^{2,*}, 张宪省¹, 冯纪年³, 石宝才², 宫亚军², 黄大卫^{4,5}

(1. 山东农业大学生命科学学院, 山东泰安 271018; 2. 北京市农林科学院植保环保研究所, 北京 100097;

3. 西北农林科技大学植保学院, 陕西杨凌 712100; 4. 中国科学院动物研究所, 北京 100080;

5. 山东农业大学植物保护学院, 山东泰安 271018)

摘要: 用 PCR 产物直接测序法对入侵害虫西花蓟马和其他 8 种蓟马的线粒体 CO I 基因 433 bp 片段测序, 获得 62 个个体的序列。分子数据分析显示: 种内个体间平均遗传距离在 0~0.005 之间, 2003 年在北京发现的西花蓟马与欧洲等地区报导的西花蓟马不存在明显的遗传差异; 9 种蓟马种间平均遗传距离为 0.213。构建的 NJ 树可以很好的显示蓟马的聚类, 物种各单元型最初分支自展值均达到 100%。结果表明, 基于 PCR 及直接测序技术的分子鉴定可以达到准确鉴定蓟马物种之目的。

关键词: 缨翅目; 蓟马; 分子鉴定; 线粒体 DNA; CO I 基因; 遗传距离; NJ 树

中图分类号: Q969 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2007)07-0720-07

Molecular identification of the introduced western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) and other eight common thrips species (Thysanoptera: Thripidae)

YOU Zhong-Hua^{1,2}, LU Hong^{2,*}, ZHANG Xian-Sheng¹, FENG Ji-Nian³, SHI Bao-Cai², GONG Ya-Jun², HUANG Da-Wei^{4,5} (1. College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China; 2. Institute of Plant and Environmental Protection, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100097, China; 3. College of Plant Protection, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China; 4. Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China; 5. Plant Protection College, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: The 433 base pair segments of the mitochondrial cytochrome oxidase I (CO I) gene from 62 individuals of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) and other 8 common thrips species in China were sequenced. The DNA data analysis showed that the average intra-species genetic distance was 0–0.005; there was no significant genetic divergence between the western flower thrips found in Beijing in 2003 and those reported internationally. The average interspecies genetic distance was 0.213. Thrips individuals of the same species were successfully clustered by NJ tree. The bootstrap values of the original divergence among intra-species haplotypes amounted to 100%. The results show that molecular identification based on PCR and direct sequencing is desirable for identifying thrips species.

Key words: Thysanoptera; thrips; molecular identification; mtDNA; CO I gene; genetic distance; Neighbour-Joining tree

蓟马(Thysanoptera)种类繁多,全世界已知大约有 5 500 种。有记载对农作物造成严重危害的蓟马种类仅占蓟马总数的 1% (Morse and Hoddle, 2006)。蓟马一般个体微小(< 2 mm),适生性强,繁殖率高,

隐藏于植物的不同部位危害,危害初期常不易被发现。有的蓟马不仅对农作物造成直接危害,而且可以传播植物病毒,如西花蓟马 *Frankliniella occidentalis*、烟蓟马 *Thrips tabaci* 等(Boonham et al.,

基金项目:国家自然科学基金委重点项目(30330090);“十一五”国家科技支撑计划(2006BAD08A08-27)

作者简介:游中华,男,1981 年生,山东人,硕士研究生,研究方向为蔬菜蓟马生物生态综合治理

* 通讯作者 Author for correspondence, Tel.: 010-51503439; E-mail: luhong1688@sohu.com

收稿日期 Received: 2007-01-15; 接受日期 Accepted: 2007-06-13

2002 ;Jenser *et al.* ,2003)。这些蓟马一旦传播病毒 ,会给农业生产带来严重的损失。近十几年来 ,温室栽培迅速发展并成为蔬菜种植的重要形式 ,为蓟马、蚜虫、白粉虱等小型温室害虫常年发生提供了场所。由于国际间农产品贸易增加 ,生物入侵事件频繁发生 ,如棕榈蓟马 *Thrips palmi*、西花蓟马已广泛传播到世界各地 ,并在入侵地上升为主要害虫 ,给农业经济造成严重损失(Kirk and Terry ,2003 ;Walsh *et al.* ,2005)。

准确的物种鉴定是物种检疫、分布调查及种群发生动态研究的前提 ,也是深入开展生物学、综合防治等研究的基础。传统的鉴定主要依赖于物种的形态特征 ,但存在较大的局限 : (1)蓟马近缘种之间的区别特征少且不明显 ,传统方法容易造成错误鉴别 ; (2)用传统的方法几乎无法做到鉴定同种蓟马的不同生物型或不同地理种群 ; (3)传统的鉴定方法难以提供针对蓟马幼虫或缺缺个体的鉴别。

基于 PCR 技术的分子鉴定为物种的鉴定提供了新的手段 ,弥补了传统形态鉴定的诸多不足 ,可以检测物种间及同种个体间的细微差别。利用分子标记鉴定物种已有不少尝试 ,如 Ward 等(2005)完成了对澳大利亚 207 种鱼类的分子编码 ,同年 ,Ball 和 Heber(2005)尝试用分子条码鉴别 70 多种水生昆虫蜉蝣(Ephemeroptera)。近几年已开展了蓟马的分子鉴定 ,Moritz 等(2000)以 ITS-RFLP 法鉴别多种蓟马 ,Brunner 等(2002)基于 CO I 基因部分片段讨论直接测序法及 PCR-RFLP 法鉴别 10 种重要蓟马的可能性 ,后来又应用该标记探讨了与寄主相关的两个烟蓟马类型(Brunner *et al.* ,2004) ,林峻贤等(2003)则用基于 28S rDNA 和 16S rDNA 的 Multiplex-PCR 及 PCR-RFLP 技术来鉴定西花蓟马和烟蓟马。鉴于线粒体 CO I 基因在物种鉴别方面的独特优点(肖金花等 ,2004) ,物种鉴定多选择该基因作分子标记。

本文用线粒体 CO I 基因片段作为分子标记 ,对包括入侵种西花蓟马在内的 9 种常见蓟马进行 PCR 产物直接测序鉴定 ,并分析蓟马种群的遗传分化情况以及不同蓟马物种之间的遗传分化距离 ,探讨利用直接测序法鉴定中国常见害虫蓟马的可行性。

1 材料和方法

1.1 标本的采集与鉴定

1.1.1 标本采集 :研究所用蓟马均为雌成虫 ,标本采集地点、采集时间、危害寄主等信息见表 1。将田

间采集到的蓟马浸泡于纯酒精中保存在 - 20℃ 冰柜中备用。

1.1.2 物种鉴定 :物种的鉴定工作由蓟马分类专家完成。9 种蓟马分属锯尾亚目(Terebrantia Haliday)蓟马科(Thripidae Stephens)的 3 个属——花蓟马属 *Frankliniella* Karny、蓟马属 *Thrips* Linnaeus 和大蓟马属 *Megalurothrips* Bagnall ,多为属内形态相似的近缘种。其中黄蓟马 *Thrips flavus* 为形态特征与棕榈蓟马极为相似的物种 ,二者的主要区别特征为单眼间鬃在前后单眼间的着生位置(韩运发 ,1997) ,选择这两种进行分子鉴定我们可以检验分子方法区别形态特征相似种的可行性。

1.2 DNA 提取

在提取 DNA 之前 ,将已鉴定过并浸泡在纯酒精的标本在 Nikon SMZ1500 解剖镜下根据蓟马的主要鉴别特征再次鉴定。随机挑取单头蓟马雌虫 ,采用经典的酚仿抽提法提取 DNA。将单头标本浸入蒸馏水中除去酒精 ,移入 TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl ,1 mmol/L EDTA ,pH8.0)中浸泡 1 h ,然后将虫体转移至 200 μ L 提取液(10 mmol/L Tris-HCl ,1 mmol/L EDTA ,1% SDS ,pH8.0)中充分研磨 ;加入 2.5 μ L 蛋白酶 K(20 mg/mL)于研磨后的匀浆液中 ,混匀后于 56℃ 消化 3 h ;第一次抽提加 1 倍体积苯酚/氯仿(1 : 1)于反应混合液中 ,混匀 ,离心 10 min(4℃ ,10 000 r/min)。吸取上清后用等体积氯仿按上法再抽提一次。吸取上清 ,用 1/10 体积 3 mol/L NaAc(pH5.2)和 2 倍体积 100% 冰冻乙醇沉淀 1 ~ 3 h ,离心 30 min(4℃ ,12 000 r/min) ,弃上清 ,晾干后用 30 μ L 无菌水溶解 DNA ,该 DNA 溶液即可用于 PCR 扩增。

1.3 PCR 扩增与测序

PCR 反应所用引物为 : mtD-7.2F 5'-ATTAGGAGCHCCHGAYATAGCATT-3' , mtD-9.2R 5'-CAGGCAAGATTAAAATATAAACTTGG-3' (Brunner *et al.* ,2002) ,由上海生工生物工程技术有限公司合成。

PCR 反应采用 25 μ L 标准反应体系 ,其中含有 2 μ L DNA 溶液 ,2.5 μ L 10 $\times$ Pfu buffer ,0.6 μ L Mg²⁺ (100 mmol/L) ,0.5 μ L 10 mmol/L dNTP 混合液 ,引物 (10 μ mol/L)各 0.8 μ L ,Pfu DNA 聚合酶(2.5 U/ μ L ,北京全式金生物技术有限公司)0.5 μ L。反应条件为 : 94℃ 变性 5 min ;94℃ 30 s ,48℃ 40 s ,72℃ 1 min ,30 个循环后 72℃ 保温 10 min。取 2.5 μ L 扩增产物于含有溴化乙锭的 1% 琼脂糖凝胶中电泳 ,电泳结束后在紫外光下检测结果并拍照。

所得目的片段采用 PCR 产物直接双向测序 ,测序反应均在 ABI 3730XL 测序仪上进行。
序由北京诺赛基因组研究中心有限公司完成 ,测序

表 1 9 种蓟马的采集信息及序列登录号
Table 1 Collection data and GenBank accession numbers of nine thrips species

物种 Species	采集地点 Collecting locality	采集时间 Collecting time	寄主 Host	测序个体数 Number of tested individuals	单元型数目 Number of haplotypes	GenBank 登录号 GenBank accession no.
花蓟马 <i>F. intonsa</i>	北京 Beijing	2006.7	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i> 土豆 <i>Solanum tuberosum</i> 等	15		
	山东聊城 Liaocheng, Shandong	2005.9	黄瓜 <i>C. sativus</i>	2		
	山东泰安 Tai'an, Shandong	2006.6	黄瓜 <i>C. sativus</i>	2		
	陕西杨凌 Yangling, Shaanxi	2006.7	冬瓜 <i>Benincas hispida</i>	1	7	EF213747 ~ EF213753
	山西 Shanxi	2006.7	不详 No records	1		
	浙江杭州 Hangzhou, Zhejiang	2006.8	茄子 <i>Solanum melongena</i>	1		
	海南 Hainan	2006.3	节瓜 <i>Beninca. coshispida</i> var. <i>chieh-qu</i>	1		
	山东泰安 Tai'an, Shandong	2006.6	玉米 <i>Zea mays</i>	6	1	EF213761
西花蓟马 <i>F. occidentalis</i>	北京 Beijing	2005.9	黄瓜 <i>C. sativus</i>	3	2	EF213765 EF213766
烟蓟马 <i>T. tabaci</i>	北京 Beijing	2005.9	洋葱 <i>Allium cepa</i> 韭菜 <i>Allium tuberosum</i>	6		
	山东泰安 Tai'an, Shandong	2006.6	韭菜 <i>A. tuberosum</i>	4	5	EF213754 ~ EF213758
	浙江杭州 Hangzhou, Zhejiang	2006.8	黄瓜 <i>C. sativus</i>	1	1	EF213764
黄蓟马 <i>T. flavus</i>	河北 Hebei	2006.7	不详 Unknown	6	1	EF213767
黄胸蓟马 <i>T. hawaiiensis</i>	山东泰安 Tai'an, Shandong	2006.7	扁豆 <i>Phaseolus vulgaris</i>	5	1	EF213763
葱韭蓟马 <i>T. alliorum</i>	山东泰安 Tai'an, Shandong	2006.6	韭菜 <i>A. tuberosum</i>	5	1	EF213762
普通大蓟马 <i>M. usitatus</i>	海南 Hainan	2006.3	节瓜 <i>B. coshispida</i> var. <i>chieh-qu</i> 黄瓜 <i>C. sativus</i> 等	3	2	EF213759 EF213760

1.4 数据分析

1.4.1 计算遗传距离 :所扩增片段不存在插入与缺失现象 ,故序列的比对比较简单 ,利用 CLUSTAL W 软件直接比对。计算种间遗传距离所选取的单元型序列为每种蓟马出现频率最高的单元型 ,对于以相近频率出现的单元型则随机选取。遗传距离的计算基于 Kimura-2-Parameter(K2P)双参数模型。种内平均遗传距离的计算由同一物种各个个体所得序列两两比对得出。

1.4.2 构建系统发育树 :为了更直观的显示分子鉴定用于区分蓟马各物种的有效性 ,采用邻接法

(Neighbour-Joining Method ,NJ)构建系统发育树 ,计算方法仍然基于 K2P 双参数模型。建树时加入了 Brunner 等(2002)所得 10 种蓟马的分子数据(所引用序列的 GenBank 登录号及物种名称均在系统发育树树枝末端注明) ,旨在比较国外主要害虫蓟马与中国分布的同种害虫蓟马之间的遗传差异。

选择 *Oncothrips rodwayi* 作为外群 ,分子序列从 NCBI 获得(U93522)。进化树的检验运用 Bootstrap 1 000个重复。序列分析及发育树的构建采用软件 MEGA 3.1(Kumar *et al.* , 2001)。

2 结果与分析

2.1 序列测定与分析

本研究所用引物能够很好地扩增出所选 9 种蓟马的目的片段,且所得 PCR 产物可以直接用于测序反应。测序得到 9 种蓟马的 62 个个体的序列,每条序列 433 个碱基,共 21 个单元型。代表 9 种蓟马的单元型序列比对结果如图 1 所示。序列分析结果表明,该标记片段在种内相当保守,种内平均遗传距离在 0~0.005 之间(表 2),核苷酸突变均为同义突变,多发生于密码子的第 3 位,多数为转换。花蓟马 23 个个体存在 7 个单元型,个体间平均遗传距离为 0.005,烟蓟马 10 个个体 5 个单元型,个体间平均遗传距离为 0.003。相比之下,该片段在种间变异程

度较高,两两比对平均有 79 个位点发生核苷酸替换,转换位点 38 个,颠换位点 41 个, $R=0.9$ ($R=$ 转换数/颠换数)。其中发生于密码子第 1 位的替代 16 个, $R=3.4$;第 2 位发生替代 6 个, $R=0.6$;第 3 位发生替代 58 个, $R=0.7$ 。种间遗传距离在 0.154~0.259 之间,平均种间遗传距离为 0.213。

2.2 构建系统发育树

基于 K2P 双参数模型构建的 NJ 树如图 2。从树的拓扑结构可以看出,花蓟马属 3 个近缘种具有较密切的关系。除 *T. angusticeps* 外,本研究中的蓟马属各物种也基本聚在一起。新入侵中国的西花蓟马与 Brunner 等(2002)研究的西花蓟马的 4 个单元型也聚在同一支,花蓟马、烟蓟马及棕榈蓟马的各个单元型均各自聚在一支,同一物种不同单元型的最初分支自展值均达到 100%。

表 2 基于 Kimura 2P 的种间遗传距离和种内平均遗传距离
Table 2 Genetic distance of interspecies and intra-species based on Kimura2P

	<i>T. tabaci</i>	<i>F. intonsa</i>	<i>F. occidentalis</i>	<i>F. tenuicornis</i>	<i>M. usitatus</i>	<i>T. alliorum</i>	<i>T. flavus</i>	<i>T. hawaiiensis</i>	<i>T. palmi</i>
<i>T. tabaci</i>	0.003								
<i>F. intonsa</i>	0.242	0.005							
<i>F. occidentalis</i>	0.259	0.233	0.002						
<i>F. tenuicornis</i>	0.225	0.199	0.180	0.000					
<i>M. usitatus</i>	0.218	0.251	0.216	0.222	0.005				
<i>T. alliorum</i>	0.217	0.235	0.193	0.226	0.225	0.000			
<i>T. flavus</i>	0.232	0.255	0.210	0.219	0.240	0.195	0.000		
<i>T. hawaiiensis</i>	0.174	0.216	0.211	0.212	0.200	0.154	0.182	0.000	
<i>T. palmi</i>	0.220	0.223	0.223	0.217	0.209	0.171	0.177	0.173	0.000

3 讨论

利用线粒体 CO I 基因部分 DNA 序列来区分物种比较大的争议之一在于难以提供给一个统一的区分标准,即究竟序列分歧度多大才能确定为两个不同的物种(肖金花等,2004)。然而,现有的数据表明,大多数物种均表现为低的种内遗传差异及相对较高的种间差异,CO I 可以胜任物种的鉴别(Hebert *et al.*, 2003; Ball and Hebert, 2005; Ward *et al.*, 2005; Hajibabaei *et al.*, 2006)。

我们的结果表明,同种蓟马的不同个体之间的遗传差异均很小,核苷酸的改变均为同义突变,种内个体间平均遗传距离在 0~0.005 之间,种内没有明显的地理差异和与寄主相关的差异。以花蓟马为例,采自陕西、山西、浙江、山东、北京、海南等地区的 23 头花蓟马共包括 7 个单元型,出现频率最高的单元型的个体采自不同地区,这说明在花蓟马种群间

可能存在着广泛的基因交流。从系统发育树上可以看出,入侵北京的西花蓟马种群与国外其他地区报导的西花蓟马种群不存在明显的遗传差异。烟蓟马和棕榈蓟马也有类似的现象。相反,不同种蓟马之间均存在明显的遗传差异。黄蓟马与棕榈蓟马在形态上极为相似,二者主要鉴别特征仅为单眼间鬃在 3 个单眼间的着生位置,黄蓟马的单眼间鬃位于前后单眼中心连线之内,而棕榈蓟马的单眼间鬃在连线之外,而分子数据分析显示,二者的核苷酸序列比对共发现 68 个替代, $R=1.1$,遗传距离为 0.177,二者间存在明显的遗传差异。Brunner 等(2002)所做研究也表明,同种蓟马不同个体间差异细微,而种间差异则相对显著(序列分歧度为 0.160~0.254)。

通过建树进行物种聚类是我们在得到某个个体的分子数据后对其进行物种身份鉴定时比较直观有效的方法。NJ 法可以简便快捷地构建系统树,同时比较适合于分析较大的数据集,自展检验也比较省时(Nei and Kumar, 2000)。而且,从 NJ 树的自展检验

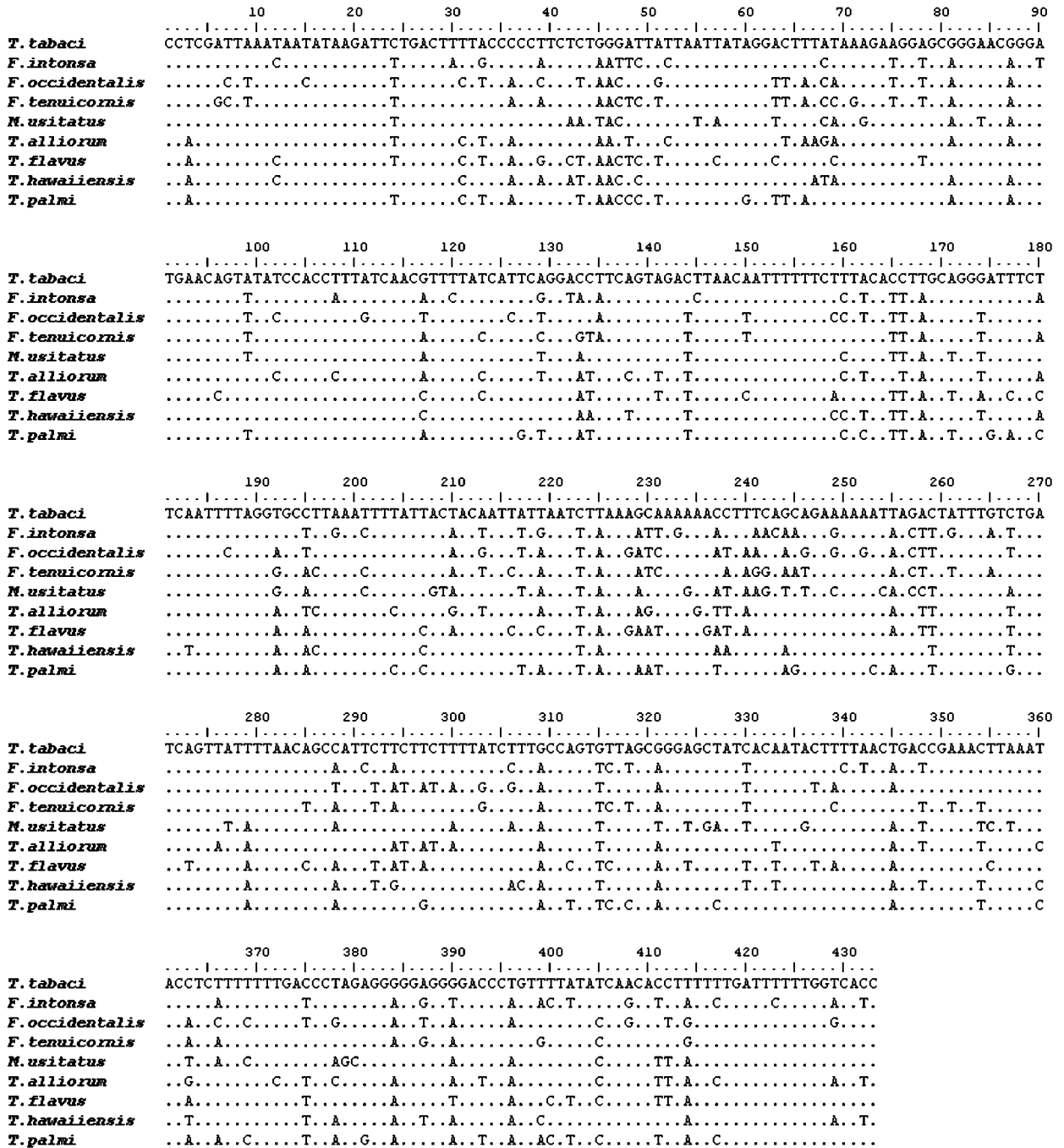


图 1 9 种蓟马的单元型序列比对

Fig. 1 Alignment of haplotypes of 9 thrips species

短线表示与对比序列相同的核苷酸。Dots indicate nucleotides identical with the compared sequence.

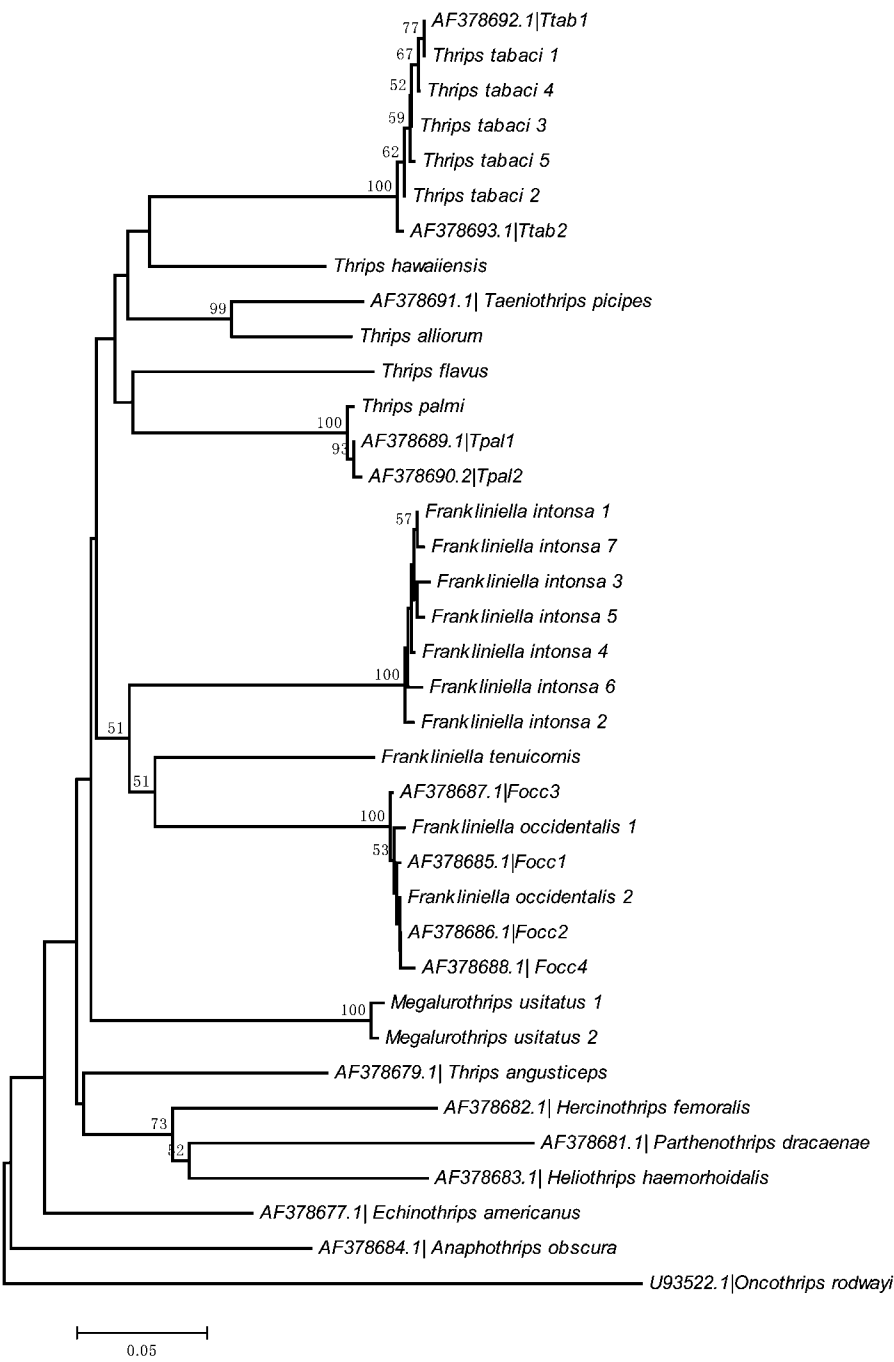


图 2 基于 CO I 基因构建的 16 种蓟马的系统发育 NJ 树

Fig. 2 NJ tree among 16 thrips species based on CO I gene

树枝上方数字为 > 50% 的自展值(1 000 次重复)。Numbers on branches are bootstrap value > 50% (1 000 replications).

值看,同一物种不同单元型的最初分支自展值均达到 100%,说明基于 Kimura-2-Parameter 双参数模型的 NJ 树可以很好地满足物种鉴定的需要。

致谢 浙江省农科院植物保护与微生物所贝亚维老师采集棕榈蓟马等标本、西北农林科技大学郭付振与杨晓娜协助制作标本、中国科学院动物所姚建老师协助检索玻片标本,特表谢忱。

参 考 文 献 (References)

Ball SL, Hebert PDN, 2005. Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. *J. N. Am. Benthol. Soc.*, 24(3): 508 – 524.

Boonham N, Smith P, Walsh K, Tame J, Morris J, Spence N, Bennison J, Barker I, 2002. The detection of tomato spotted wilt virus (TSWV) in individual thrips using real time fluorescent RT-PCR (TaqMan). *Journal of Virological Methods*, 101(1 – 2): 37 – 48.

- 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. *Agricultural and Forest Entomology*, 4(2): 127–136.
- Brunner PC, Chatzivassiliou EK, Katis NI, Frey JE, 2004. Host-associated genetic differentiation in *Thrips tabaci* (Insecta: Thysanoptera), as determined from mtDNA sequence data. *Heredity*, 93(4): 364–370.
- Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, Hallwachs W, Hebert PDN, 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *PNAS*, 103(4): 968–971.
- Han YF, 1997. Economic Insect Fauna of China (Thysanoptera). Vol. 55. Beijing: Science Press. 299–300. [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. 299–300]
- Hebert PDN, Ratnasingham S, de Waard JR, 2003. Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(Suppl.): S96–S99.
- Jenser G, Gaborjanyi R, Szenasi A, Almasi A, Grasselli M, 2003. Significance of hibernated *Thrips tabaci* Lindeman (Thysan., Thripidae) adults in the epidemic of tomato spotted wilt virus. *Journal of Applied Entomology*, 127(1): 7–11.
- Kirk WDJ, Terry LI, 2003. The spread of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Agricultural and Forest Entomology*, 3(4): 301–310.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M, 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*, 17(12): 1244–1245.
- Lin JX, Ye WB, Wang QL, 2003. Identification of plant quarantine pest-western flower thrips by Multiplex-PCR and PCR-RFLP. *Formosan Entomol.*, 23: 353–366. [林峻贤, 叶文斌, 王清玲, 2003. Multiplex-PCR 及 PCR-RFLP 于检疫害虫西花蓟马的鉴定. 台湾昆虫, 23: 353–366]
- Moritz G, Delker C, Paulsen M, Mound LA, Burgermeister W, 2000. Modern Methods for Identification of Thysanoptera. The EPPO Conference on Diagnostic Techniques for Plant Pests, Wageningen (NL).
- Morse JG, Hoddle MS, 2006. Invasion biology of thrips. *Annu. Rev. Entomol.*, 51: 67–89.
- Nei M, Kumar S, 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press.
- Walsh K, Boonham N, Barker I, Collins DW, 2005. Development of a sequence-specific real-time PCR to the melon thrips *Thrips palmi* (Thysan., Thripidae). *Journal of Applied Entomology*, 129(5): 272–279.
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN, 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 360(1462): 1847–1857.
- Xiao JH, Xiao H, Huang DW, 2004. DNA barcoding: new approach of biological taxonomy. *Acta Zoologica Sinica*, 50(5): 852–855. [肖金花, 肖晖, 黄大卫, 2004. 生物分类学的新动向——DNA 条形码. 动物学报, 50(5): 852–855]

(责任编辑: 袁德成)