



马光昌, 王晓妮, 牛黎明, 等. 快速鉴定新菠萝灰粉蚧的分子标记技术 [J]. 环境昆虫学报, 2017, 39 (4): 893–897.

快速鉴定新菠萝灰粉蚧的分子标记技术

马光昌, 王晓妮, 牛黎明, 龚 治, 温海波, 金启安, 彭正强*

(中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 海口 571101)

摘 要: 新菠萝灰粉蚧 *Dysmicoccus neobrevipes* (Beardsley) 是一种严重为害剑麻、番荔枝等经济作物的入侵性害虫。由于粉蚧类昆虫体型较小, 且外部形态十分相似, 难以达到快速准确识别。本文利用分子标记技术, 研究了新菠萝灰粉蚧的快速鉴定方法。通过对新菠萝灰粉蚧、扶桑绵粉蚧、双条拂粉蚧、杰克贝尔氏粉蚧、大洋臀纹粉蚧、木槿曼粉蚧、甘蔗粉蚧和木瓜粉蚧等 8 种粉蚧的序列进行分析, 针对新菠萝灰粉蚧设计了 1 对特异性引物, 其扩增片段大小为 552 bp (GenBank 登录号为 MF 363108), 该引物对其它 7 种粉蚧没有扩增能力。该引物不仅对新菠萝灰粉蚧成虫具有扩增效能, 对 1 龄若虫、2 龄若虫和 3 龄若虫都具有同样的扩增能力, 其最低检出阈值为 437.5 pg/μL。该技术的建立, 实现了在剑麻等苗木调运过程中对新菠萝灰粉蚧的快速准确鉴定, 同时对新菠萝灰粉蚧的检疫和监测也具有重要的意义。

关键词: 新菠萝灰粉蚧; 分子标记; 快速鉴定; 特异性扩增

中图分类号: Q963; S412

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2017) 04-0893-05

Molecular marker technique for rapid identification of *Dysmicoccus neobrevipes* (Beardsley)

MA Guang-Chang, WANG Xiao-Ni, NIU Li-Ming, GONG Zhi, WEN Hai-Bo, JIN Qi-An, PENG Zheng-Qiang* (Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agriculture Science, Haikou 571101, China)

Abstract: *Dysmicoccus neobrevipes* (Beardsley) is an invasive pest, which tremendously harms economic crops including *Agave sisalana* and *Annona squamosa*. It is very hard to rapidly and accurately distinguishing mealybugs because of their small size and similarity in external morphology. In this study, we had developed a method for the rapid differentiation of *D. neobrevipes* by molecular marker technique. Sequences of *D. neobrevipes*, *Phenacoccus solenopsis* Tinsley, *Ferrisia virgata* Cockerell, *Pseudococcus jackbeardsleyi*, *Planococcus minor* Maskell, *Maconellicoccus hirsutus*, *Saccharicoccus sacchari* Cockerell and *Paracoccus marginatus* were analysed. A pair of specific primers which is specific to *D. neobrevipes* was designed. A single 552 bp (GenBank accession number: MF 363108) fragment was amplified using the specific primers only in *D. neobrevipes*. No fragments were amplified using the specific primers in other mealybugs. The amplification ability of specific primer was proved to be capable for not only adults but also 1st, 2nd and 3rd instar of *D. neobrevipes*. Moreover, the assays was capable of detecting 437.5 pg/μL. This technique should be useful tool for pest rapid diagnosis, quarantine and monitoring during transportation of seedlings like *A. sisalana*.

Key words: *Dysmicoccus neobrevipes* (Beardsley); molecular marker; rapid identification; specific amplification

基金项目: 公益性行业 (农业) 科研专项经费“南繁区生物安全监测预警及控制关键技术研究及示范”(201403075); 国家重点研发计划项目 (2016YFC1201200)

作者简介: 马光昌, 男, 1981 年生, 山西人, 硕士, 助理研究员, 研究方向为入侵害虫生物防治, E-mail: mgc53@126.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: lypzhq@163.com

收稿日期 Received: 2017-06-01; **接受日期** Accepted: 2017-06-21

新菠萝灰粉蚧 *Dysmicoccus neobrevipes* (Beardsley) 属半翅目 Hemiptera, 粉蚧科 Pseudococcidae, 洁粉蚧属 *Dysmicoccus* (Beardsley, 1959), 被我国列为进境植物检疫性有害生物。该虫主要分布在美国夏威夷、墨西哥、巴哈马群岛、西印度群岛、哥伦比亚以及巴西等地区, 是当地发生最严重的一种有害生物。

新菠萝灰粉蚧寄主广泛, 主要为害剑麻、菠萝、柑橘、番茄、可可和香蕉等农林经济作物 (Jayma *et al.*, 1992; 林晓佳等, 2013), 尤其是剑麻为害最为严重。在 1998 年, 该害虫首次在我国海南省昌江县剑麻产区发现, 为新入侵海南害虫。该害虫为胎生, 有群集的习性, 主要在剑麻的根、茎、叶片部位聚集, 且可隐藏在剑麻叶片的裂缝和翘皮下 (张小冬等, 2008)。该害虫主要刺吸剑麻的汁液, 以嫩叶为主, 影响剑麻的生长发育, 其分泌蜜露可引致煤烟病, 直接影响剑麻的产量和质量, 危害严重时可导致剑麻植株死亡。近年来, 该虫在海南和广东剑麻产区暴发成灾, 造成剑麻减产多达 30% (陈泽坦等, 2010)。

新菠萝灰粉蚧雌成虫虫体呈椭圆形, 体外被白色蜡质分泌物覆盖。体长约 2.5–4.5 mm, 宽约 1.5–2.0 mm。触角细索状, 共 8 节, 尾端有 2 根显著伸长的臀瓣刺。1 龄若虫虫体呈长椭圆形, 体色为淡黄色, 体长约 0.5 mm, 单眼 1 对, 红色。后期背部有少量均匀的蜡质分布。2 龄若虫体色由黄褐色变淡灰色加深。达到 3 龄若虫时虫体被自身所分泌的蜡质物均匀覆盖 (Beardsley, 1965; 汤昉德, 1992; 王子清, 2001; 张小冬等, 2008)。由于蚧虫体极小, 单凭传统的形态分类方法 (个体大小、刚毛的长短和透明孔的有无等特征) 进行鉴定耗时耗力。因此, 本文针对新菠萝灰粉蚧研究了其快速分子鉴定技术, 同时以扶桑绵粉蚧、双条拂粉蚧、杰克贝尔氏粉蚧、大洋臀纹粉蚧、木槿曼粉蚧、甘蔗粉蚧和木瓜粉蚧等粉蚧为靶标进行了特异性检验。研究结果旨在为有效地阻止新菠萝灰粉蚧通过剑麻苗木调运等方式从疫区向非疫区为害或向其他寄主蔓延, 尽可能降低其所造成的经济损失和传播扩散的速度, 保障国家的农业生产安全及其产品贸易安全。

1 材料与方法

1.1 供试材料

将野外采集到的粉蚧标本浸泡于 95% 酒精放入 -20°C 冰箱中备用。经传统的形态分类鉴定后, 粉蚧种类主要有新菠萝灰粉蚧、扶桑绵粉蚧、双条拂粉蚧、杰克贝尔氏粉蚧、大洋臀纹粉蚧、木槿曼粉蚧、甘蔗粉蚧和木瓜粉蚧等 8 种。

1.2 粉蚧 DNA 提取

采用酚氯仿抽提法提取 DNA。将单头粉蚧标本置于含有 200 μL 提取液 (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 1% SDS, pH 8.0) 中, 用封口枪头充分研磨; 加入 5 μL 蛋白酶 K (20 mg/mL) 于研磨后的匀浆液中, 混匀后于 56°C 水浴 2 h (每 30 min 混匀 1 次); 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°C , 10000 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 2 倍体积 100% 冰冻乙醇沉淀 1 h, 离心 20 min (4°C , 12000 r/min), 弃上清, 晾干后用 30 μL 无菌水充分溶解 DNA 于 -20°C 保存备用。

1.3 PCR 扩增与克隆测序

采用核糖体 rDNA 区通用引物 ITS18S: (5'-TACACACCGCCCGTCGCTACTA-3') 和 ITS5.8S: (5'-ATGTGCGTTCRAAATGTCGATGTTCA-3') 进行扩增。引物由上海生工生物技术有限公司合成。PCR 反应采用 25 μL 反应体系, 其中含有 2 μL DNA 溶液, 2.5 μL 10 $\times$ Pfu buffer, 0.6 μL Mg^{2+} (100 mmol/L), 0.5 μL 10 mmol/L dNTP 混合液, 引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.8 μL , Pfu DNA 聚合酶 (2.5 U/ μL , 北京全式金生物技术有限公司) 0.5 μL , 17.3 μL ddH₂O。反应条件为: 94°C 变性 5 min; 95°C 20 s, 53°C 40 s, 72°C 1 min, 35 个循环后 72°C 保温 8 min。取 2.5 μL 扩增产物于含有溴化乙锭的 1% 琼脂糖凝胶电泳, 电泳结束后在紫外光下检测结果并拍照。

所得目的片段用 PCR 产物直接双向测序, 测序由南京金斯瑞生物科技有限公司完成。

1.4 序列分析与新菠萝灰粉蚧特异性引物设计

对获得的 8 种不同粉蚧的序列进行比对分析,

针对新菠萝灰粉蚧, 找到该虫与其它粉蚧的特异区域, 利用 Oligo 6.0 软件, 在这个区域设计新菠萝灰粉蚧的特异性引物 D. ne-F: 5'-ATTGAACGACCGCAGTGA-3' 和 D. ne-R: 5'-GTCTGTTTATACTTGGGG-3' (上海生工生物技术有限公司合成), 扩增片段 552 bp (GenBank 登录号为 MF 363108)。PCR 的反应体系为 15 μ L, 其中, 10 $\times$ PCR Buffer 1.5 μ L, 各 2.5 mM 的 dNTP Mixture 1.2 μ L, 10 μ M D. ne-F/D. ne-R 引物各 0.2 μ L, 25 mM Mg^{2+} 1.2 μ L, BSA 0.3 μ L, TaKaRa Taq 0.2 μ L, 10 ng 模板 DNA 0.6 μ L, ddH₂O 9.6 μ L; PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 2.5 μ L 扩增产物于含有溴化乙锭的 1% 琼脂糖凝胶电泳, 电泳结束后在紫外光下检测结果并拍照。

1.5 新菠萝灰粉蚧引物的种特异性及灵敏性检验

分别以新菠萝灰粉蚧、扶桑绵粉蚧、双条拂粉蚧、杰克贝尔氏粉蚧、大洋臀纹粉蚧、木槿曼粉蚧、甘蔗粉蚧和木瓜粉蚧的 DNA 为模板, 检验新菠萝灰粉蚧特异性片段扩增引物 D. ne-F/D. ne-R 的种特异性。与此同时, 提取不同虫态 (1 龄若

虫、2 龄若虫、3 龄若虫和成虫) 的新菠萝灰粉蚧的 DNA 为模板, 对目的片段扩增效果进行检验。取单头成虫原模板 DNA 溶液 (140 ng/ μ L) 稀释 10 倍后以 2 倍进行递减稀释至 437.5 pg/ μ L, 然后以稀释后的浓度为模板 (14 ng/ μ L、7 ng/ μ L、3.5 ng/ μ L、1.75 ng/ μ L、875 pg/ μ L、437.5 pg/ μ L) 进行最低检出阈值的测定。每一种类和不同虫态的样本分别检测 3 头。

2 结果与分析

2.1 新菠萝灰粉蚧引物的种特异性检测

以所设计的 D. ne-F/D. ne-R 新菠萝灰粉蚧种特异性引物分别对新菠萝灰粉蚧、扶桑绵粉蚧、双条拂粉蚧、杰克贝尔氏粉蚧、大洋臀纹粉蚧、木槿曼粉蚧、甘蔗粉蚧和木瓜粉蚧等 8 种粉蚧的 DNA 模板进行扩增和电泳检测, 结果如下 (图 1): 该引物只能针对新菠萝灰粉蚧扩增出 552 bp 大小的片段, 而对其它粉蚧不具有扩增能力, 表明所设计的 D. ne-F/D. ne-R 为新菠萝灰粉蚧种特异性引物。

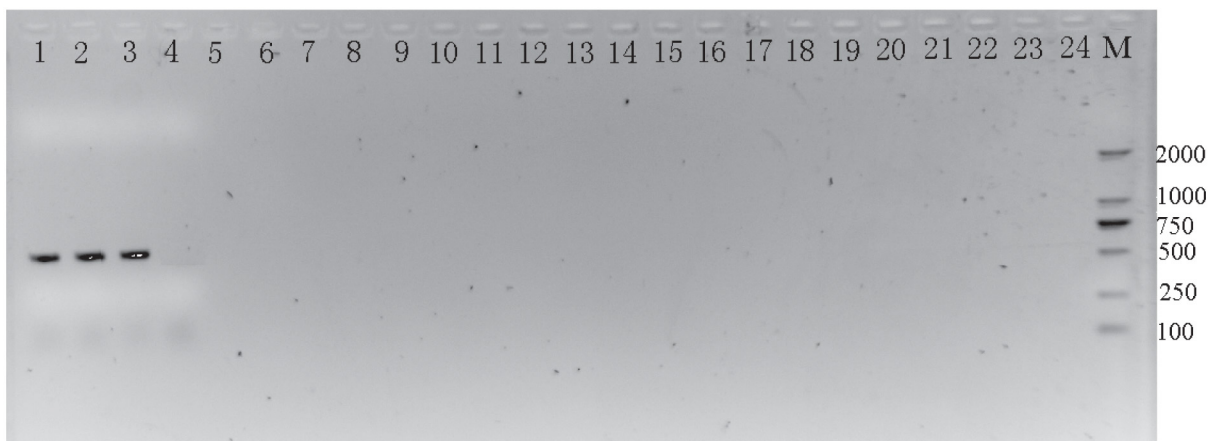


图 1 用 D. ne-F/D. ne-R 特异性引物对新菠萝灰粉蚧及近缘种扩增的结果

Fig. 1 The amplification result of *Dysmicoccus neobrevipes* and its related species using specific primer D. ne-F/D. ne-R
注: M: 分子标记, 1, 2, 3 为新菠萝灰粉蚧; 4, 5, 6 为扶桑绵粉蚧; 7, 8, 9 为双条拂粉蚧; 10, 11, 12 为杰克贝尔氏粉蚧; 13, 14, 15 为大洋臀纹粉蚧; 16, 17, 18 为木槿曼粉蚧; 19, 20, 21 为甘蔗粉蚧; 22, 23, 24 为木瓜粉蚧。Note: M: DNA Marker, 1, 2, 3: *Dysmicoccus neobrevipes*; 4, 5, 6: *Phenacoccus solenopsis* Tinsley; 7, 8, 9: *Ferrisia virgata* Cockerell; 10, 11, 12: *Pseudococcus jackbeardsleyi*; 13, 14, 15: *Planococcus minor* Maskell; 16, 17, 18: *Maconelliococcus hirsutus*; 19, 20, 21: *Saccharicoccus sacchari* Cockerell; 22, 23, 24: *Paracoccus marginatus*.

2.2 新菠萝灰粉蚧种特异性引物对不同虫态和不同稀释倍数模板 DNA 检测

以新菠萝灰粉蚧不同虫态的 DNA 为模板, 以 D. ne-F/D. ne-R 为特异性引物进行 PCR 扩增, 该引物对不同虫态的新菠萝灰粉蚧都能稳定的扩增出 552 bp 大小的片段 (图 2); 此外, 当将单头成虫模板 DNA 稀释为 14 ng/ μ L、7 ng/ μ L、3.5 ng/ μ L、1.75 ng/ μ L、875 pg/ μ L、437.5 pg/ μ L 等不同浓度时进行 PCR 扩增和电泳检测, 结果表明, 当稀释为 437.5 pg/ μ L 时, 仍然可以有效、特异地扩增出 552 bp 大小的片段 (图 3), 表明该引物具有较高的灵敏性。

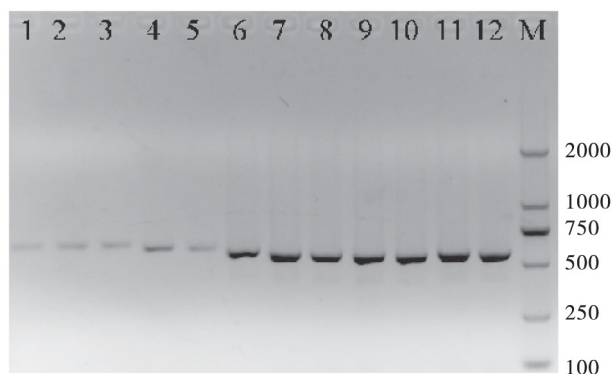


图 2 用 D. ne-F/D. ne-R 特异性引物对新菠萝灰粉蚧不同虫态扩增的结果

Fig. 2 The amplification result of different developmental stages of *Dysmicoccus neobrevipes* using specific primer D. ne-F/D. ne-R

注: M: 分子标记, 1, 2, 3 为 1 龄若虫; 4, 5, 6 为 2 龄若虫; 7, 8, 9 为 3 龄若虫; 10, 11, 12 为成虫。
Note: M: DNA Maker, 1, 2, 3: 1st instar; 4, 5, 6: 2nd instar; 7, 8, 9: 3rd instar; 10, 11, 12: adult.

3 结论与讨论

本文通过对新菠萝灰粉蚧、扶桑绵粉蚧、双条拂粉蚧、杰克贝尔氏粉蚧、大洋臀纹粉蚧、木槿曼粉蚧、甘蔗粉蚧和木瓜粉蚧等 8 种粉蚧的 ITS 序列进行测定, 通过序列分析比对, 针对新菠萝灰粉蚧设计出了一对种特异性引物, 该引物可以特异性的扩增出 552 bp 大小的片段, 而对其它 7 种粉蚧没有扩增能力, 能有效快速地鉴定出新菠萝灰粉蚧; 该引物不仅对新菠萝灰粉蚧的成虫具有良好的扩增能力, 而且对单头 1 龄若虫、2 龄若虫和 3 龄若虫也都有同样的扩增效果; 此外, 该

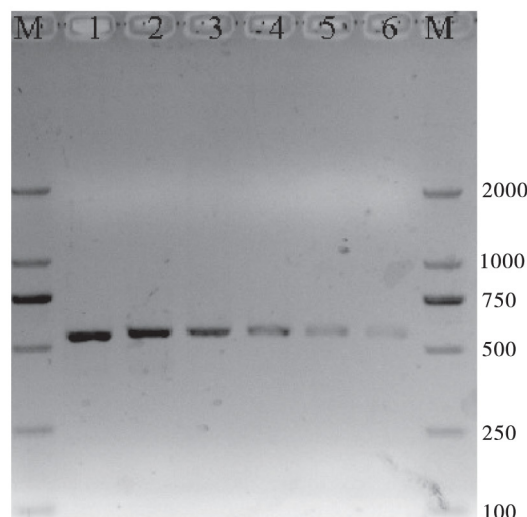


图 3 用 D. ne-F/D. ne-R 特异性引物对新菠萝灰粉蚧的最低检出阈值

Fig. 3 The minimum threshold for *Dysmicoccus neobrevipes* using specific primer D. ne-F/D. ne-R

注: M: 分子标记, 1 - 6 分别为 14 ng/ μ L、7 ng/ μ L、3.5 ng/ μ L、1.75 ng/ μ L、875 pg/ μ L、437.5 pg/ μ L。Note: M: DNA Maker, 1 - 6 represent 14 ng/ μ L、7 ng/ μ L、3.5 ng/ μ L、1.75 ng/ μ L、875 pg/ μ L、437.5 pg/ μ L.

引物还可以检测出最低浓度为 437.5 pg/ μ L, 具有较强的敏感性。然而由于粉蚧种类较多, 有许多种类在本文中未曾涉及, 因此, 对所设计的新菠萝灰粉蚧特异性引物尚需要做进一步的检测。

到目前为止, 对粉蚧类昆虫的鉴别主要是依据其成虫外部形态特征, 但粉蚧类昆虫是外部形态十分相似的一类害虫, 有些种类鲜见雄虫, 可供比较的形态学特征是有限的, 而且有些形态分类特征并不稳定, 如有些粉蚧的个体大小、刚毛的长短和透明孔的有无都可能受外部环境的影响, 低龄若虫形态分类特征更加不稳定 (Cox, 1983)。近年来, 随着分子生物学技术的广泛应用, 粉蚧类昆虫的鉴定取得了重大进展。Beuning 等 (1999) 通过获得 *Pseudococcus viburni* (Signoret)、*P. longispinus* (Targiono-Tozzetti)、*P. calceolariae* (Maskell) 和 *P. similans* (Lidgett) 的 ITS 序列, 并设计特异性引物来对这 4 种粉蚧进行了分子鉴定, 而此特异性引物还可用于成虫、卵和若虫等材料的鉴定; 徐浪等 (2016) 利用 mtDNA COI 基因设计了两组特异性引物和 MGB 探针, 应用 TaqMan 实时荧光 PCR 方法对新菠萝灰粉蚧和菠萝灰粉蚧进行了快速准确鉴定; 徐浪等 (2013) 测

定了 7 种粉蚧的 COI 序列, 并与 BOLD 和 Genbank 中的 DNA 条形码数据库比对, 实现了相关蚧虫的快速准确鉴定。本文所设计的新菠萝灰粉蚧种特异性引物能够不受其发育阶段和环境因素制约, 准确、简单、快速的鉴定出新菠萝灰粉蚧, 该技术的建立, 将为检验检疫部门提供有效的检测方法, 同时对防治外来粉蚧也具有重要意义。

参考文献 (References)

- Beardsley JW. On the taxonomy of pineapple mealybug in Hawaii, with a description of a previously unnamed species (Homoptera: Pseudococcidae) [J]. *Proc. of Hawaiian Entomol.*, 1959, 17 (1): 29–37.
- Beardsley JW. Notes on the pineapple mealybug complex, with descriptions of two new species (Homoptera: Pseudococcidae) [J]. *Proc. of Hawaiian Entomol. Society*, 1965, 19 (1): 55–68.
- Beuning LL, Murphy P, Wu E. Molecular-based approach to the differentiation of mealybug (Hemiptera: Pseudococcidae) species [J]. *Economic Entomology*, 1999, 92 (2): 463–472.
- Chen ZT, Zhang XD, Zhang N, et al. Life table of the laboratory population of *Dysmicoccus neobrevipes* (Beardsley) at different temperatures [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2010, 31 (3): 464–468. 陈泽坦, 张小冬, 张妮, 等. 不同温度条件下新菠萝灰粉蚧实验种群生命表 [J]. *热带作物学报*, 2010, 31 (3): 464–468.
- Cox JM. An experimental study of morphological variation in mealybugs (Homoptera: Coccoidea: Pseudococcidae) [J]. *Systematic Entomology*, 1983, 8 (4): 361–382.
- Jayma L, Martin Kessing, Ronald F, et al. *Dysmicoccus neobrevipes* (Beardsley) [M]. Honolulu Hawaii: Department of Entomology, 1992.
- Lin XJ, W R, Chen WJ, et al. Research progress on *Dysmicoccus neobrevipes* (Beardsley) [J]. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 2013, 11: 1387–1391. 林晓佳, 吴蓉, 陈吴健, 等. 新菠萝灰粉蚧研究进展 [J]. *浙江农业科学*, 2013, 11: 1387–1391.
- Tang FD. The Pseudococcidae of China [M]. Beijing: China Agricultural Sciencetech Press, 1992: 767. 汤祚德. 中国粉蚧科 [M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1992: 767.
- Wang ZQ. Fauna Sinica, Insecta. Vol. 22, Homoptera Coccoidea [M]. Beijing: Science Press, 2001. 王子清. 中国动物志昆虫纲第二十二卷: 同翅目 蚧总科 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- Xu L, Yu DJ, Jiao Y, et al. Molecular identification of *Dysmicoccus neobrevipes* and related species through DNA barcoding [J]. *Plant Quarantine*, 2013, 27 (3): 66–69. 徐浪, 余道坚, 焦懿, 等. 新菠萝灰粉蚧及其近似种的 DNA 条形码鉴定 [J]. *植物检疫*, 2013, 27 (3): 66–69.
- Xu L, Lin W, Huang PY, et al. Rapid detection of *Dysmicoccus neobrevipes* and *D. brevipes* (Hemiptera: Diaspididae) using TaqMan MGB probe [J]. *Plant Quarantine*, 2016, 30 (4): 38–41. 徐浪, 林伟, 黄蓬英, 等. 应用 TaqMan MGB 探针快速检测新菠萝灰粉蚧和菠萝灰粉蚧 [J]. *植物检疫*, 2016, 30 (4): 38–41.
- Zhang XD, Chen ZT, Zhong YH, et al. Elementary study on the life habits of *Dysmicoccus neobrevipes* (Beardsley) [J]. *Entomological Journal of East China*, 2008, 17 (1): 22–25. 张小冬, 陈泽坦, 钟义海, 等. 新菠萝灰粉蚧生活习性初探 [J]. *华东昆虫学报*, 2008, 17 (1): 22–25.