

米尔顿姬小蜂 rDNA ITS1 和 ITS2 的 序列分析及其分子鉴定*

黄蓬英^{1**} 廖富荣¹ 林玲玲¹ 洪钦阳² 李雯琳² 林石明¹

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

摘要 本研究测定了米尔顿姬小蜂 *Anselmella miltoni* Girault 的 rDNA ITS1 和 ITS2 序列,以探讨其分子鉴定方法。米尔顿姬小蜂的 ITS1 和 ITS2 侧翼区(18S 和 5.8S)序列相对稳定,ITS1 和 ITS2 序列存在种间差异。根据 18S rDNA 部分序列,利用 DNAMAN 的 Maximum Likelihood 方法构建了与膜翅目其它科的系统发育树。根据米尔顿姬小蜂 ITS1 和 ITS2 序列设计了特异性引物,应用特异性引物对样品进行了 PCR 扩增,扩增效果理想,采用上述特异性引物可从单头米尔顿姬小蜂稳定地扩增出明显的目的 DNA 条带。因此,可以采用 ITS1 和 ITS2 区的特异性对米尔顿姬小蜂进行快速的分子鉴定。

关键词 米尔顿姬小蜂, rDNA, ITS1, ITS2, 特异引物, 分子鉴定

Molecular identification of *Anselmella miltoni* Girault through analysis of rDNA ITS1 and ITS2 sequences

HUANG Peng-Ying^{1**} LIAO Fu-Rong¹ LIN Ling-Ling¹

HONG Qin-Yang² LI Wen-Lin² LIN Shi-Ming¹

(1. Xiamen Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Xiamen 361012, China;

2. College of Plant Protection, Fujian Agricultural and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract In order to explore the potential for the molecular identification of *Anselmella miltoni* Girault complete sequences of its rDNA ITS1 and ITS2 were determined. Although the flanking regions of rDNA ITS1 and ITS2 showed only limited variation, the complete sequences differed significantly in different species. A phylogenetic tree was inferred from 18S rDNA part sequences using DNAMAN Maximum Likelihood. Species-specific primers of *A. miltoni* were designed based on the rDNA ITS1 and ITS2 sequences. The results of PCR amplification of rDNA ITS1 and ITS2 indicate that the species-specific primers were applicable. The results show that specific primers could produce clear, unique and reproducible target DNA bands from individual adult wasps. Molecular identification of *A. miltoni* using species-specific primers from rDNA ITS1 and ITS2 region is therefore feasible.

Key words *Anselmella miltoni*, rDNA, ITS1, ITS2, diagnostic primers, molecular identification

米尔顿姬小蜂 *Anselmella miltoni* Girault 隶属于小蜂总科 Chalcidoidea, 姬小蜂科 Eulophidae, *Anselmella* 属。姬小蜂科体长约 1~3 mm, 具 4 节跗节, 大部分种类是寄生性的, 有一小部分是植食性。Girault 于 1925 年建立了 *Anselmella* 属, 目前该属包含 4 种, 其幼虫都是植食性的, 以取食蒲桃属 (*Syzygium*) 类的种子发育。米尔顿姬小蜂原来

仅在澳大利亚有分布, 现已扩大到中国台湾地区, 2005—2011 年厦门口岸多次从台湾进境的莲雾中截获此虫。该类型水果是无核的, 遭受危害后, 形成一个看起来像核桃模样的虫瘿, 不仅影响水果的产量, 而且使其失去食用价值(黄蓬英等, 2005)。

rDNA 是目前广泛使用的细胞核分子标记,

* 资助项目: 农业部公益性行业科研专项(200903034)、厦门市科技计划项目(3502Z20112016, 3502Z20092009)。

** E-mail: hpy7766@163.com

收稿日期: 2011-05-30, 接受日期: 2011-07-01

rDNA 单位由 18S、5.8S、28S RNA 编码区、基因间隔区(IGS)、第 1 和第 2 转录间隔区(ITS1、ITS2)、外转录间隔区(EST)组成,编码区的序列高度保守,间隔区的进化速度大约与物种形成的进程相仿(Miler *et al.*, 1996; Ji *et al.*, 2003; 张仁利等, 2007)。由于 rDNA-ITS 在种内相当保守,而在种间表现出一定的变异,是区分种和种下阶元的理想分子标记,所以可以设计保守的通用引物,在不同物种中扩增变异性较高的非编码区(李正西, 2001)。刘玉娣等(2009)利用 ITS2 区成功对褐飞虱、白背飞虱和灰飞虱进行快速分子鉴定;耿金虎等(2004)利用 ITS2 序列的“种保守区域”设计诊断引物实现对我国 3 种赤眼蜂的分子鉴定;王莉萍等(2007)利用 rDNA-ITS1 序列分析和比较了不同地理种群美洲斑蝇及近缘种的关系;Pinto 等(2002)利用 ITS2 区对北美寄生于鳞翅目害虫的赤眼蜂的 2 个种进行研究。利用 18S rDNA 研究膜翅目 10 个总科(Carpenter and Wheeler, 1999)、茧蜂科蚜茧蜂亚科的系统发育关系也有相关报道(Sanchis *et al.*, 2000)。对于姬小蜂科 *Anselmella* 属分子研究,仅澳大利亚测定了米尔顿姬小蜂 28S rDNA 序列,其余未见报道。

米尔顿姬小蜂个体微小,只有 1~2 mm,与近似种区别较小,利用传统的形态学特征进行鉴定一直非常困难,在鉴定过程中费时,费力,只有少数不多的分类专家才能胜任。本研究测定了米尔顿姬小蜂的 ITS1 和 ITS2 的完整序列,对 2 个区段序列进行了分析;根据 18S rDNA 部分序列,利用 DNAMAN 的 Maximum Likelihood 计算方法构建与膜翅目其它科的系统发育树;根据 rDNA ITS1 和 ITS2 的序列设计了特异引物,建立了快速鉴定米尔顿姬小蜂的分子方法。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

米尔顿姬小蜂 2005—2007 年从进境台湾莲雾中截获,桉树枝瘿姬小蜂 *Leptocybe invasa* Fisher & LaSalle 于 2009 年采自海南省儋州市白马井镇尾叶桉,刺桐姬小蜂 *Quadrastichus erythrinae* Kim 于 2008 年采自福建省厦门市海湾公园刺桐,所有标本用 100% 酒精浸泡,保存于 -70℃ 冰箱中备用。

1.2 主要的试剂和仪器

DNA 提取试剂盒购自 TaKaRa 宝生物工程(大连)生物工程有限公司, Dream Taq™ DNA 聚合酶购自 Fermentas 公司, PCR 引物合成、克隆与测序委托上海生工生物工程公司完成, PCR 仪: BIO-RAD 公司 PTC-200。

1.3 总 DNA 的提取

采用 TaKaRa 公司生产的通用基因组 DNA 提取试剂盒(Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver 3.0)提取基因组 DNA。

1.4 ITS 的 PCR 扩增

本研究中所用的扩增 ITS1 序列引物对 18sF1/5p8sB1d 参照 Sha 等(2007)设计,扩增 ITS2 序列引物对 ITS2F/R 参照 Campbell 和 Wheeler(1999)。50 μL 反应体系如下: dNTP Mixture(2.5 mmol/L) 4 μL, 10 × Dream Taq™ Buffer (includes 20 mmol/L MgCl₂) 5 μL, 上游引物、下游引物(10 μmol/L)各 2.0 μL, Dream Taq™ DNA Polymerase(5 U/μL) 0.25 μL, 模板 DNA 4 μL, 加灭菌双蒸水(DDW)至终体积。反应参数如下: 95℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 45 s, T_m 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 运行 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 7 min。

1.5 克隆测序及序列分析

PCR 产物回收纯化后委托上海生工生物工程公司完成克隆及序列测定。

将测序所得 DNA 序列通过 NCBI 作 BLAST 相似性检索,经人工核对后确认所得的序列片段,用 DNAMAN 和 DNACLU 软件进行序列的剪裁与分析。

在 GENBANK 下载了小蜂总科中金小蜂科广大腿小蜂 *Muscidifurax raptorellus* (GenBank 登录号: DQ 412040), 金小蜂科的 *Muscidifurax zaraptor* (GenBank 登录号: DQ 412039), 金小蜂科的 *Nasonia vitripennis* (GenBank 登录号: GQ410677), 赤眼蜂 1 种 *Trichogramma* sp. (GenBank 登录号: GQ228084), 长尾小蜂科的 *Megastigmus transvaalensis* (GenBank 登录号: GQ410676), 蚜小蜂科的 *Aphelinus gossypii* (GenBank 登录号: AY216700), 蚁蜂科的 *Dasymutilla gloriosa* (GenBank 登录号: DQ408505), 蚁蜂科的

Dilophotopsis concolor (GenBank 登录号: DQ415673), 蚁蜂科的 *Odontophotopsis melicausa* (GenBank 登录号: DQ415677), 蚁科的热带火蚁 *Solenopsis geminata* (GenBank 登录号: AJ969247), 蚁科的 *Myrmecia croslandi* (GenBank 登录号: AB052895), 姬蜂科的 *Campoletis sonorensis* (GenBank 登录号: GQ252977), 茧蜂科的 *Diachasmimorpha longicaudata* (GenBank 登录号: FJ475128) 序列进行比较, 采用 DNAMAN 的 Maximum Likelihood 方法绘制分子系统发育树。

1.6 特异性引物设计与合成

根据米尔顿姬小蜂 rDNA 的 ITS1 和 ITS2 的测序和比对结果, 应用 Primer premier 5 软件比对, 为米尔顿姬小蜂在 rDNA ITS1 和 ITS2 区各设计了一条特异性引物 MITS1 和 MITS2 (表 1)。引物由

上海生工生物工程公司合成。

1.7 米尔顿姬小蜂特异性 PCR 检测

25 μ L 反应体系包括: 10 $\times$ Dream Taq™ Buffer (includes 20 mmol/L $MgCl_2$) 2.5 μ L, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 2 μ L, 上游引物 MITS2-F (10 μ mol/L) 1.5 μ L, 下游引物 MITS2-R (10 μ mol/L) 1.5 μ L, Dream Taq™ DNA Polymerase (5 U/ μ L) 0.2 μ L, 模板 DNA 4 μ L, 加灭菌双蒸水至终体积。反应参数: 95℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 45 s, 58℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 运行 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 7 min。

1.8 米尔顿姬小蜂特异性高灵敏 PCR 检测

取单只米尔顿姬小蜂、桉树枝瘿姬小蜂、刺桐姬小蜂, 按潘力 (2010) 方法提取总 DNA, 再进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳检测结果。

表 1 特异性引物序列与目标扩增产物大小

Table 1 Species-specific primers sequences and the target product size

特异性引物 Species-specific primers	引物序列 (5'-3') Primer sequences	产物大小 (bp) Product size
MITS1F	CCGTCCAGCAGACTGTTC	450
MITS1R	AGAGCGACGCCCTGATAGA	
MITS2F	TCGGAAGTGTCAATAGGCG	
MITS2R	TCCATCTCGCATTACCCTC	317

2 结果与分析

2.1 米尔顿姬小蜂 ITS 的 PCR 扩增

利用 ITS 通用引物对米尔顿姬小蜂进行 PCR 扩增, 结果表明, 引物 18sF1/5p8sB1d 扩增到约 900 bp 的条带, 引物 ITS2F/ITS2R 扩增到约 550 bp 的条带 (图 1)。

2.2 米尔顿姬小蜂 ITS 的序列分析

测序结果表明, 分别获得了 922 bp 和 548 bp 的序列。经拼接后, 共获得了 1 426 bp 的米尔顿姬小蜂的 ITS 区序列。序列分析表明, 该序列含有 175 bp 的部分 18S rDNA, 646 bp 的完整 ITS1, 146 bp 5.8S rDNA, 414 bp 的完整 ITS2, 45 bp 的部分 28S rDNA。碱基组成分析表明, ITS1 区 A + T 含量较高, 为 51.85%, 5.8S 区 A + T 含量较低, 为 45.89%, ITS2 区 A + T 含量较高, 为 54.11%。

GenBank 登录号为: JF970194。

米尔顿姬小蜂与膜翅目其它种类的同源性 (表 2) 表明, 18S rDNA 同源性在 28.2% ~ 98.1% 之间, ITS1 同源性在 25.3% ~ 43.9% 之间, 5.8S rDNA 的同源性在 96.5% ~ 99.1% 之间, ITS2 同源性在 33.7% ~ 51.8% 之间。说明 18S rDNA、5.8S rDNA 序列相对保守, ITS1 和 ITS2 序列存在种间差异。

根据 18S rDNA 部分序列, 利用 DNAMAN 的 Maximum Likelihood 计算方法构建系统发育树 (图 2)。小蜂总科的各个种类聚合成一大支, 米尔顿姬小蜂与长尾小蜂 *Megastigmus transvaalensis*, 丽蝇蛹集金小蜂的 *Nasonia vitripennis* 聚合在一起, 再与蚜小蜂 *Aphelinus gossypii* 聚合在一起, 接着与金小蜂的 *Muscidifurax zaraptor* 聚合在一起, 再与金小蜂科广大腿小蜂聚合在一起, 最后与赤眼蜂 *Trichogramma* sp. 聚合成一大支; 蚁蜂的 3 个种类聚合在一起后与茧蜂科的 *Diachasmimorpha*

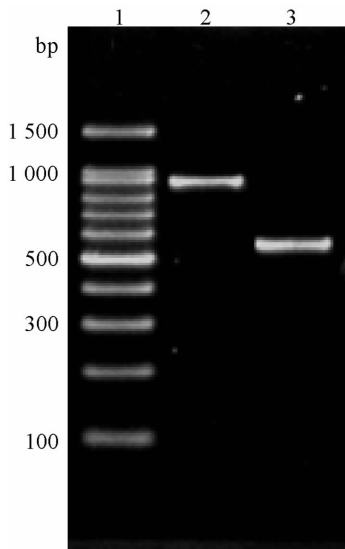


图 1 米尔顿姬小蜂 ITS 的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification of rDNA ITS1 and ITS2 genes in *Anselmella miltoni*

1: 100 bp DNA marker; 2: 引物对 18sF1/5p8sB1d 扩增获得的条带 PCR amplification with 18sF1/5p8sB1d primer; 3: 引物对 ITS2F/ITS2R 扩增获得的条带 PCR amplification with ITS2F/ITS2R primer.

表 2 米尔顿姬小蜂与膜翅目其它种类的同源性比较

Table 2 Comparability homology of *Anselmella miltoni* and other species of Hymenoptera

Genbank	18S rDNA	ITS1	5. 8S rDNA	ITS2
DQ412040	97. 7%	39. 1%	—	—
DQ412039	97. 7%	35. 7%	—	—
GQ228084	96. 6%	25. 6%	—	40. 4%
DQ408505	66. 3%	25. 3%	96. 5%	37. 4%
DQ415673	66. 3%	31. 0%	96. 5%	51. 8%
AJ969247	92. 9%	24. 0%	99. 1%	33. 7%
GQ252977	28. 2%	43. 9%	96. 5%	—
DQ415677	66. 3%	27. 2%	96. 5%	42. 9%
AB052895	61. 3%	27. 3%	98. 1%	30. 2%
GQ410676	98. 7%	—	—	—
FJ475128	66. 9%	25. 5%	—	—
AY216700	95. 9%	—	—	—
GQ410677	98. 1%	—	—	—

注: “/”表示没有相应的数据。

“/” indicates no data.

longicaudata 聚合成一支, 再与小蜂总科各个科聚

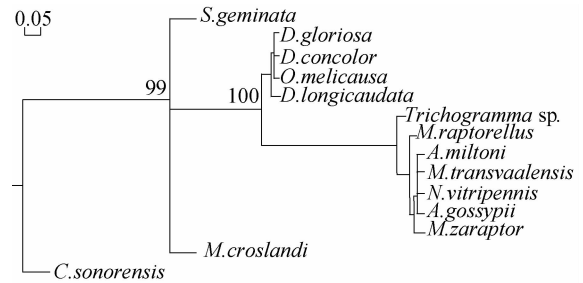


图 2 基于 18S rDNA 部分序列构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree inferred from 18S rDNA part sequences using DNAMAN Maximum Likelihood

合成一大支。这一大支与蚁科的热带火蚁和 *Myrmecia croslandi* 2 个种形成 3 大分支。米尔顿姬小蜂与姬蜂科的 *Camponotus sonorensis* 亲缘关系最远。

从图 2 可以看出, 米尔顿姬小蜂与长尾小蜂 *Megastigmus transvaalensis*、丽蝇蛹集金小蜂的 *Nasonia vitripennis* 亲缘关系最近, 与姬蜂科亲缘关系最远。

2.3 PCR 扩增鉴定米尔顿姬小蜂

根据米尔顿姬小蜂 ITS1 和 ITS2 序列与其它小蜂存在种间差异, 采用设计特异性引物的方法鉴别米尔顿姬小蜂。以桉树枝瘿姬小蜂、刺桐姬小蜂为对照样品, 特异性引物 PCR 扩增结果见图 3。在 ITS1 区, 可扩增到大小为 436 bp PCR 产物, 在 ITS2 区, 可扩增到大小为 317 bp PCR 产物, 对照样品均无扩增产物。ITS1 和 ITS2 的特异性引物扩增效果均理想。因此, 本研究设计的米尔顿姬小蜂 ITS1 和 ITS2 特异引物可以对米尔顿姬小蜂进行快速的分子鉴定。

2.4 米尔顿姬小蜂特异性引物扩增灵敏度检验

将 ITS1 和 ITS2 区的特异性引物, 对单只米尔顿姬小蜂进行扩增检验, 以检验特异性引物的扩增灵敏度。以单只桉树枝瘿姬小蜂、刺桐姬小蜂为对照样品。同样, 在 ITS1 区可扩增到大小为 436 bp PCR 产物, 在 ITS2 区也可扩增到大小为 317 bp PCR 产物, 对照样品均无扩增产物(图 4)。这表明建立的 PCR 方法具有良好的灵敏度, 可用于单只米尔顿姬小蜂的快速检测。

3 讨论

本研究测定出了米尔顿姬小蜂 rDNA ITS1 和

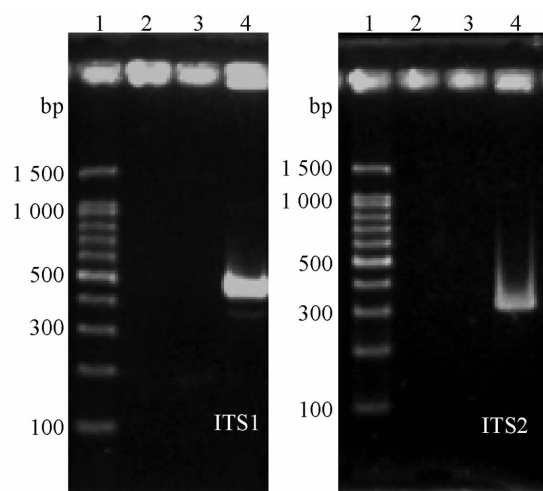


图3 利用 rDNA ITS1 和 ITS2 区特异性引物对米尔顿姬小蜂、桉树枝瘿姬小蜂、刺桐姬小蜂 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 3 PCR amplification by using rDNA ITS1 and ITS2 species-specific primers of *Anselmella miltoni*, *Leptocybe invasa* and *Quadrastichus erythrinae*
1: 100 bp DNA marker; 2: 桉树枝瘿姬小蜂 *Leptocybe invasa*; 3: 刺桐姬小蜂 *Quadrastichus erythrinae*; 4: 米尔顿姬小蜂 *Anselmella miltoni*.

ITS2 的全序列, ITS1 和 ITS2 序列显示出一定的 AT 偏好性。所得 18S rDNA 序列与小蜂总科的赤眼蜂科、金小蜂科、长尾小蜂科、蚜小蜂科种类同源性高。5.8S rDNA 序列与姬蜂、蚁蜂的种类同源性极高。说明 18S rDNA 和 5.8S rDNA 序列相对保守。利用 18S rDNA 部分序列研究了米尔顿姬小蜂与膜翅目其它种类系统关系, 米尔顿姬小蜂与长尾小蜂 *Megastigmus transvaalensis*、金小蜂的 *Nasonia vitripennis* 亲缘关系最近, 与姬蜂亲缘关系最远。这与形态学亲缘关系相一致, 也说明了 18S rDNA 可用于科、族、亚族和属级水平的系统发育。

通过米尔顿姬小蜂“种保守区域”设计了特异性引物, 发现 ITS1 和 ITS2 区的特异性引物在米尔顿姬小蜂具有良好的特异性。与米尔顿姬小蜂同属的种类还有棒角莲雾姬小蜂 *Anselmella malacia*、*Anselmella kerrihi*、*Anselmella oculata*, 但这些种类的标本无法收集到, 也没有相应的 ITS 序列, 因而无法进一步对特异性引物进行验证。通过对特异性引物单头蜂的检测, 证明特异性引物可从单头蜂稳定地扩增出明显的目的 DNA 条带, 说明特异性引物扩增灵敏度高。由于物种特异性引物操作

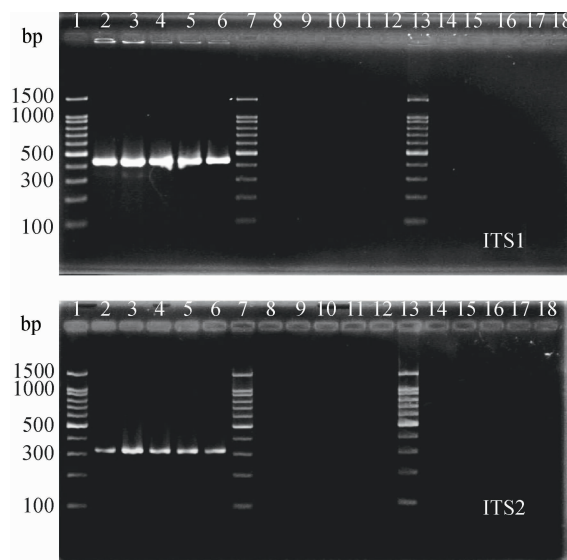


图4 利用 rDNA ITS1 和 ITS2 区特异性引物对单只米尔顿姬小蜂、桉树枝瘿姬小蜂、刺桐姬小蜂 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 4 PCR amplification by using rDNA ITS1 and ITS2 species-specific primers of individual *Anselmella miltoni*, *Leptocybe invasa* and *Quadrastichus erythrinae*

1, 7, 13: 100 bp DNA marker; 2-6: 米尔顿姬小蜂 *Anselmella miltoni*; 8-12: 刺桐姬小蜂 *Quadrastichus erythrinae*; 14-18: 桉树枝瘿姬小蜂 *Leptocybe invasa*.

简单, 成本低, 可重复性好, 而且检测结果准确, 因而更符合实际研究的需要。本研究中报道的米尔顿姬小蜂特异性引物为其快速鉴别提供了有效的工具。

参考文献 (References)

- Carpenter JM, Wheeler WC, 1999. Towards simultaneous analysis of morphological and molecular data in Hymenoptera. *Zool. Scri.*, 28(1/2): 251—260.
- Ji YJ, Zhang DX, He LJ, 2003. Evolutionary conservation and versatility of a new set of primers for amplifying the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) regions in sects and other invertebrates. *Mol. Ecol. Notes*, 3(4): 581—585.
- Miller BR, Crabtree MB, Savage HM, 1996. Phylogeny of fourteen *Culex* mosquito species, including the *Culex pipiens* complex, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Insect Mol. Biol.*, 5(2): 93—107.
- Pinto JD, Koopmanschap AB, Platner GR, Stouthamer R, 2002. The North American *Trichogramma* (Hymenoptera;

- Trichogrammatidae) parasitizing certain Tortricidae (Lepidoptera) on apple and pear, with ITS2 DNA characterizations and description of a new species. *Biol. Control*, 23(2):134—142.
- Sanchis A, Latorre A, Gonzalez-Candela F, Michelena JM, 2000. An 18S Rdna-based molecular phylogeny of Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 14(2):180—194.
- Sha ZL, Zhu CD, Murphy RW, Huang DW, 2007. *Diglyphus isaea* (Hymenoptera: Eulophidae): a probable complex of cryptic species that forms important biological control agent of agromyzid leaf miners. *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, 45(2):128—135.
- 耿金虎, 李正西, 沈佐锐, 2004. 诊断引物应用于我国三种重要赤眼蜂分子鉴定的研究. *昆虫学报*, 47(5):639—644.
- 黄蓬英, 方元炜, 黄建, 林石明, 王宏毅, 2005. 中国大陆一新外来入侵种—刺桐姬小蜂. *昆虫知识*, 42(6):731—733.
- 李正西, 2001. 赤眼蜂 rDNA 分子系统学分析及蜂种诊断引物的开发和应用. 博士学位论文. 北京: 中国农业大学.
- 刘玉娣, 林克剑, 韩兰芝, 侯茂林, 2009. 基于 rDNA ITS1 和 ITS2 序列的褐飞虱、白背飞虱和灰飞虱的分子鉴定. *昆虫学报*, 52(11):1266—1272.
- 潘力, 崔翠, 王斌, 2010. 一种用于 PCR 扩增的丝状真菌 DNA 快速提取方法. *微生物学通报*, 37(3):450—453.
- 王莉萍, 杜予州, 何娅婷, 陆亚娟, 陆自强, 2007. 不同地理种群美洲斑潜蝇及近缘种的 rDNA-ITS1 序列分析和比较. *昆虫学报*, 50(6):597—603.
- 张仁利, 耿艺介, 黄达娜, 高世同, 庾蕾, 黄继莲, 宋红改, 2007. 深圳市白纹伊蚊 rDNAITS2 区克隆及 SNP 分析. *中国热带医学*, 7(1):8—11.