

利用两种不同引物扩增金龟子 COI 序列片段的研究与对比 *

田雷雷^{1,2**} 席景会² 李克斌^{1***} 孙昊雨^{1,2} 尹 姣¹ 曹雅忠¹

(1. 中国农业科学院植物保护研究所 植物病虫害国家重点实验室 北京 100193;

2. 吉林大学植物科学学院 长春 130062)

摘 要 利用两类不同的引物,即通用引物(L1490,H2198)与特异引物(Pat,Jerry)分别对4种常见金龟子线粒体细胞色素C氧化酶I(COI)基因片段序列进行扩增和测序,获得长度为689 bp与775 bp的序列。对测序结果进行遗传距离分析,并构建了4种金龟子系统进化树。结果表明,特异引物扩增序列的遗传距离在种内稳定性与种间的差异性都明显优于通用引物扩增序列,利用特异引物扩增序列所构建的系统进化树最符合实际情况,因此利用特异引物扩增序列更能够准确的对金龟子进行分类。

关键词 金龟子, COI 基因, 特异引物, 通用引物

Research and comparison of the scarab mitochondrial cytochrome C oxidase I (COI) gene fragment sequence cloned by two different primers

TIAN Lei-Lei^{1,2**} XI Jing-Hui² LI Ke-Bin^{1***} SUN Hao-Yu^{1,2} YIN Jiao¹ CAO Ya-Zhong¹

(1. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests,

Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;

2. College of Plant Science, Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract Universal primer (L1490, H2198) and specific primer (Pat, Jerry) were used for cloning the mitochondrial cytochrome C oxidase I (COI) gene fragments of four common scarabs. The homologous sequences were compared and partial nucleotide sequences of COI (689 bp, 775 bp) obtained. The genetic distances of these sequences were analysed and the sequences used to produce three kinds of phylogenetic trees. The results show that the stability and differentials of interspecific distance of the sequences amplified with specific primers are clearly higher than those of sequences amplified with a universal primer. The phylogenetic trees constructed from sequences amplified with the specific primer are more consistent with the current morphological taxonomy of these scarab species. We conclude that sequences amplified with specific primer are more accurate for scarab classification.

Key words carab, COI gene, specific primer, universal primer

金龟子(scarab)是昆虫纲、鞘翅目中的一类种类多、分布广、食性杂,很难防治的土栖性害虫,其幼虫是非常重要的地下大害虫。据调查统计,植物地下部分受害的86%是由金龟子幼虫造成的(高金生等,1987)。全球已记载的金龟子种类3

万多种,我国约有1 800多种(方晨晨等,2012),国内外已有大量的学者对金龟子的系统分类进行了研究,但是国内对低级阶元的划分观点有很多不同,有一些近缘种由于形态特别相似而很难准确区分。

* 资助项目:公益性行业(农业)科研专项(201003025);国家自然科学基金(31000853)。

**E-mail: tianleileide@163.com

*** 通讯作者, E-mail: likebin54@163.com

DNA 分类作为形态分类的很好辅助而被作为快捷准确进行物种鉴定的有效方法;同时快速兴起的 DNA 条形码技术将基于分子数据的物种快速鉴定推动到了高速发展的阶段 (Hebert *et al.*, 2003)。在 DNA 条形码的备选标记中,线粒体 COI 序列因为能够保证物种间具有足够变异,且又很容易被扩增,而被作为大部分动物类群的候选基因 (Pfenninger *et al.*, 2007)。但是研究者在扩增时使用的引物大多为 COI 序列的通用引物 L1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') 和 H2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAATCA-3') (Folmer *et al.*, 1994),该引物广泛用于多种动物的 COI 序列扩增,对各种动物的针对性相对较差 (Ball and Armstrong, 2006)。近期, Ahrens 等 (2007) 针对金龟子类群,设计出该类昆虫 CO I 的特异引物, Pat (5'-TCCAATGCACTAATCTGCCA TATTA-3') 和 Jerry (5'-CAACATTTATTTTGA TTTTTTGG-3'),并取得较好的分类效果。本试验中用到的 4 种金龟子分别为,华北大黑鳃金龟 *Hloltrichia oblita* Faldermann,主要分布在东北、华北、西北等省区。成虫取食杨、柳、榆、桑、核桃、苹果、刺槐、栎等多种果树和林木叶片,幼虫危害阔、针叶树根部及幼苗。铜绿丽金龟 *Anomala corpulenta* Motschulsky,除西藏、新疆外遍及全国。成虫危害柳、榆、松、板栗、乌桕、油茶、油桐、核桃、果树、豆类等几十种树木和植物的叶部,幼虫则取食危害植物及苗木的根部。毛黄鳃金龟 *Holotrichia trichophora* Fairmaire,分布于我国长江流或及华北各省。成虫不取食,羽化时体内储有丰盛的脂肪体,均系幼虫

期间摄取营养物质的积累。2 龄幼虫则向作物根部集中危害,主要危害夏播高粱、大豆、甘薯、谷子等,3 龄幼虫则对早播麦田形成威胁,造成严重缺苗断垅。黑绒鳃金龟 *Serica orientalis* Motschulsky,分布于河北、山东、陕西、甘肃、宁夏、辽宁等省,各地均以成虫在浅土层或覆盖物下越冬。成虫食性极杂,可食 45 科 116 属 149 种植物,较常见的有苹果、梨、梅、葡萄、桃、李、樱桃、柿、核桃、山楂及多种农作物和牧草 (魏鸿钧,1985)。这 4 种金龟子成虫形态差异较大,相对容易鉴定,但幼虫的形态特征不明显,用常规的形态学方法鉴定困难。基于这些原因,分子分类手段成为一种具有较大参考价值、快速且简便的方法。本研究将分别采用特异引物和通用引物来扩增 4 种国内常见金龟子的 COI 序列,以此比较 2 种引物对金龟子鉴定的适合性,找出可以用于金龟子分子鉴定的序列;同时也为 4 种金龟子幼虫的快速鉴定构建 DNA 条形码的基础数据。

1 材料与方法

1.1 试验用品

1.1.1 供试虫源 样品的基本信息见表 1。其中毛黄鳃金龟与黑绒鳃金龟都是在傍晚时分采集自北京市海淀区药用植物园内,铜绿丽金龟与大黑鳃金龟都是在河北省沧州市市郊采集,分别是晚上 9:00 左右在柳树树干与草坪中采集到。样品分别利用传统形态学方法进行分类,采集后置于无水乙醇中 (Ahrens and Vogler, 2008),在室温下进行保存。

表 1 样品的采集信息
Table 1 Collection data of the samples

样本号 No.	种名 Species name	采集地 Location	采集时间 Date
1	铜绿丽金龟 <i>Anomala corpulenta</i> Motschulsky	河北省沧州市	2011 年 7 月 10 日
2	铜绿丽金龟 <i>Anomala corpulenta</i> Motschulsky	河北省沧州市	2011 年 7 月 10 日
3	铜绿丽金龟 <i>Anomala corpulenta</i> Motschulsky	河北省沧州市	2011 年 7 月 10 日
4	毛黄鳃金龟 <i>Holotrichia trichophora</i> Fairmaire	北京市海淀区	2011 年 5 月 15 日
5	毛黄鳃金龟 <i>Holotrichia trichophora</i> Fairmaire	北京市海淀区	2011 年 5 月 15 日
6	黑绒金龟 <i>Serica orientalis</i> Motschulsky	北京市海淀区	2011 年 5 月 21 日
7	黑绒金龟 <i>Serica orientalis</i> Motschulsky	北京市海淀区	2011 年 5 月 21 日
8	华北大黑鳃金龟 <i>Hloltrichia oblita</i> Faldermann	河北省沧州市	2010 年 6 月 28 日
9	华北大黑鳃金龟 <i>Hloltrichia oblita</i> Faldermann	河北省沧州市	2010 年 6 月 28 日

1.1.2 供试引物与药品 本实验用到的引物由上海生工公司合成。基因组 DNA 提取试剂盒为 QiaGen 公司的 DNeasy Blood & Tissue Kit。PCR 所用药品为博迈德公司生产的 2 × Taq PCR Master Mix。DNA Marker 为全式金公司的 Trans DNA Marker II。DNA 回收所用药品为 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver 3.0。之后的连接转化所用药品为全式金公司的 pEASY-T₁ Cloning Kit 试剂盒,感受态细胞为全式金公司提供的 Trans1-T₁。测序公司为中科希林生物技术有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 4 种金龟子的 9 个样品基因组 DNA 的提取完全按照 QiaGen 公司的 DNeasy blood & Tissue Kit 试剂盒中的步骤进行 (Ahrens *et al.* ,2007)。

1.2.2 COI 基因的克隆 用提取到的总 DNA 分别利用通用引物 (L1490 与 H2198) 与特异引物 (Pat 与 Jerry) 进行扩增。20 μL PCR 体系中包括 2 μL DNA,引物 Pat 与 Jerry 各 1 μL,PCR Master Mix 10 μL 以及无菌水 6 μL (顾耘等,2002)。PCR 循环参数为:①94℃ 变性 1 min,②94℃ 变性 40 s,③45℃ 退火 40 s,④72℃ 延伸 1 min,⑤重复 5 次②~④,⑥94℃ 变性 40 s,⑦51℃ 退火 40 s,⑧82℃ 延伸 1 min,⑨重复 35 次步骤⑥~⑧,⑩72℃ 孵育 5 min,在 4℃ 条件下保存 (赖小平等,2010)。

扩增产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶中电泳分离后,在紫外灯下进行切胶,用凝胶回收试剂盒回收纯化。以 4:1 的比例将回收产物与 pEASY-T₁ 载体于 25℃ 下连接 15 min,连接产物转入 Trans-T₁ 感受态细胞中,将转化完的菌液涂布在含有氨苄青霉

素 (10⁻⁴g/mL) 的 LB/IPTG/X-gal 琼脂糖平板上。倒置于 37℃ 恒温培养箱中过夜培养,筛选转化子。经蓝白斑筛选挑取转化平板上的单个白色菌落,接种于 LB 液体中,37℃ 于恒温摇床上过夜振荡培养 (Clare *et al.* , 2007)。分装后送至北京中科希林生物技术有限责任公司进行测序。

1.2.3 序列分析 应用 BLAST 同源比对工具将测序结果与 GenBank 中的核酸数据库进行同源性比较 (Cognato, 2006),验证所测序列是否确实为 COI 序列。将所得到的 COI 序列分别利用 MEGA4.0 软件计算序列平均的碱基组成与各个样本间的遗传距离 (p-distance) (Agusti *et al.* , 2005)。并对测序结果利用 MEGA4.0 软件进行 NJ (邻接树)、ME (最小进化树)、MP (最大简约树) 3 种系统发育树的构建。

2 结果与分析

2.1 扩增 COI 序列

分别利用特异引物与通用引物扩增 COI 序列片段,克隆结果进行测序,结果通过 BLAST 对比,在 GenBank 能找到较多与其同源性很高的 COI 序列片段,证明所克隆序列为 COI 序列片段。通用引物扩增序列片段大小约为 700 bp,其中 1~9 号样本序列的 GenBank 号为: HM180444.1、FR719155.1、FN263071.1、FN263071.1、FN263071.1、JN581903.1、FN263071.1 FN263071.1、HM180444.1;特异引物扩增序列约为 800 bp,1~9 号样本序列的 GenBank 号为: DQ524530.1、DQ524530.1、DQ524530.1、DQ524505.1、DQ524505.1、DQ524422.1、DQ524422.1、DQ524535.1、DQ524535.1。而且特异引物扩增产物电泳条带特别亮,点样量相同的情况下特异引物扩

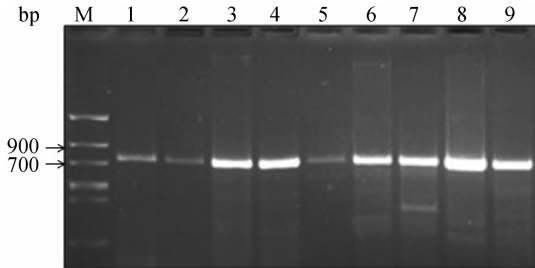


图 1 通用引物 COI PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification of COI used the universal primer
M: DNA 分子量标准 DNA marker trans DNA marker II ;
1-9:通用引物扩增产物 product of the universal primer.

增产物明显多于通用引物扩增产物,克隆序列如图 1、图 2 所示。

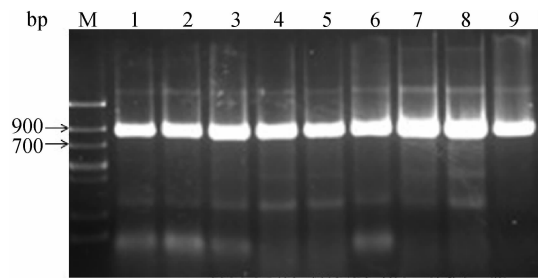


图 2 特异引物 COI PCR 扩增

Fig. 2 PCR amplification of COI used the specific primer

M: DNA 分子量标准 DNA marker trans DNA marker II ;
1-9:特异引物扩增产物 product of the specific primer.

2.2 碱基组成

利用软件分别对各个序列中的 A、T、C、G 4 种碱基含量进行分析,研究各序列中的碱基组成特点。最后得出:通用引物扩增的 COI 片段序列中 A、T、C、G 碱基平均含量分别为 29.3%、35.3%、19.4%、16.4%,其中 A + T 含量较高,为 64.6%,而 G + C 含量较低。其中第一密码子位点 A + T 含量为 72.4%,第二密码子位点 A + T 含量为 64.6%,第三密码子位点含量最低,A + T 含量为 57.1%,通用引物扩增序列中密码子在碱基使用频率上存在偏向性。特异引物扩增的 COI 序列片段中 A、T、C、G 碱基平均含量分别为 32.1%、

36.9%、16.6%、14.4%,其中 A + T 含量高达 69%,而 G + C 含量较低,其中第一密码子位点 A + T 含量为 60.4%,第二密码子位点 A + T 含量为 85.9%,而其中的 G 含量最低仅为 3.1%,第三密码子位点 A + T 含量为 60.6%,这表明特异引物扩增序列中密码子在碱基使用频率上也存在很高的偏向性。

2.3 遗传距离

利用 MEGA4.0 软件对这 4 种金龟子的 COI 扩增序列分别进行遗传距离的计算,具体各样本间的遗传距离如表 2 和表 3 所示。

表 2 通用引物扩增 COI 序列遗传距离

Table 2 Genetic distances among COI sequences amplified with universal primer

样品号 No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1									
2	0.217								
3	0.168	0.197							
4	0.168	0.197	0.000						
5	0.168	0.197	0.003	0.003					
6	0.167	0.198	0.002	0.002	0.002				
7	0.165	0.197	0.009	0.009	0.009	0.008			
8	0.214	0.209	0.048	0.048	0.052	0.050	0.058		
9	0.000	0.217	0.168	0.168	0.168	0.167	0.165	0.214	

注:样本号 1~9 代表的种类见表 1,下表同。
The species of No. 1 to 9 are same with Table 1. The same below.

表 3 特异引物扩增 COI 序列遗传距离

Table 3 Genetic distances among COI sequences amplified with specific primer

样品号 No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1									
2	0.013								
3	0.014	0.001							
4	0.169	0.159	0.160						
5	0.171	0.160	0.161	0.007					
6	0.164	0.156	0.156	0.173	0.177				
7	0.185	0.176	0.176	0.186	0.190	0.039			
8	0.181	0.172	0.173	0.154	0.152	0.182	0.198		
9	0.185	0.174	0.176	0.154	0.152	0.186	0.202	0.033	

由表 2 中所得的遗传距离可看出,各个相同种的样本间遗传距离理论上应介于 1% ~ 5%,但 1 与 2,1 与 3,2 与 3,8 与 9 号这些形态学鉴定为同一个种样本的序列间遗传距离都为 20% 左右,而像 1 与 9,3 与 4、5、6、7、8,4 与 6、7、8,5 与 6、7、8,6 与 8,7 与 8 这些形态学鉴定中为不同种的样本个体之间的遗传距离却介于 1% ~ 5%,所得结果不能表现出来一定稳定性。

经过对比,利用特异引物扩增的 COI 序列在各个金龟子的种间样本之间的遗传距离都在 15% ~ 20% 左右,在种内样本间的遗传距离都维持在 1% ~ 4%,在种间与种内的遗传距离都很稳定。

2.4 系统发育树的构建

分别对通用引物与特异引物测序结果构建系统发育树。

由图 3 中可以看出,利用通用引物扩增序列所构建的系统发育树中,样品 1 与 9,3 与 4,5 与 6 分别被划分为一组,而 7、8、2 号样本与其他样本的差异较大,但是与形态学鉴定结果不能一一对应。而利用特异引物扩增的序列构建的 3 个系统进化树中都可以将形态学分类相同的个体聚集为一个种,分别是 1、2、3 为一类,是铜绿丽金龟,4 与 5 为毛黄鳃金龟,6、7 为黑绒金龟,8、9 为大黑鳃金龟,这些结果证明,特异性引物扩增出的序列可以将这些金龟子进行准确的分类。

3 讨论

本文成功克隆到的 COI 序列与文献中所报道的大小一致 (DeSalle *et al.* , 2005 ; Antonia *et al.* ,

2007)。从电泳结果的亮度来看,特异引物扩增序列的含量明显多于通用引物扩增序列的量。造成这一现象的原因可能是由于特异引物对金龟子总 DNA 的识别效率更高的缘故。

由碱基组成的结果分析可知,在通用引物与特异引物扩增的 COI 序列中 A + T 含量分别为 63% 与 69%,都是富含 A、T 碱基,在密码子的碱基选择上存在一定的偏向性,这与其他文献中报道的 COI 序列的碱基含量相符 (Brower *et al.* , 2006)。但特异引物扩增序列中 A、T 含量较通用引物扩增序列中的高,可能是因为 2 种克隆产物是 COI 序列不同区段的片段,所以在碱基含量上稍有差别。而在通用引物扩增序列中 3 个密码子中的 A + T 含量分别为 72.4% ,64.6% ,57.1% ,特异引物扩增序列中分别为 60.4% , 85.9% , 60.6% ,在第 2 个密码子中 G 碱基含量仅为 3.1% ,在其他昆虫分子分类的文献中分类效果较好的 COI 序列也会存在一个密码子中 A + T 含量高于 80%,而 G 含量为 3% 左右的现象 (Ekrem *et al.* , 2007),这似乎是特异引物扩增序列的特性,而通用引物则不具备这一特点,至于这种结果是否可利用于其它对象,尚待进一步验证。

通过遗传距离与系统发育树的分析结果,可以看出利用特异引物扩增得到的序列更能准确地将同一个种的个体划分为一个组内,准确的将不同种的个体分到不同组群内,样本中毛黄鳃金龟与大黑鳃金龟都为鳃金龟科金龟子,较其他 2 种金龟而言,这 2 种金龟之间的亲缘关系应该更近,特异引物扩增序列构建的系统发育树中这 2 种金龟子的亲缘关系较其他 2 种金龟子近的特点也很

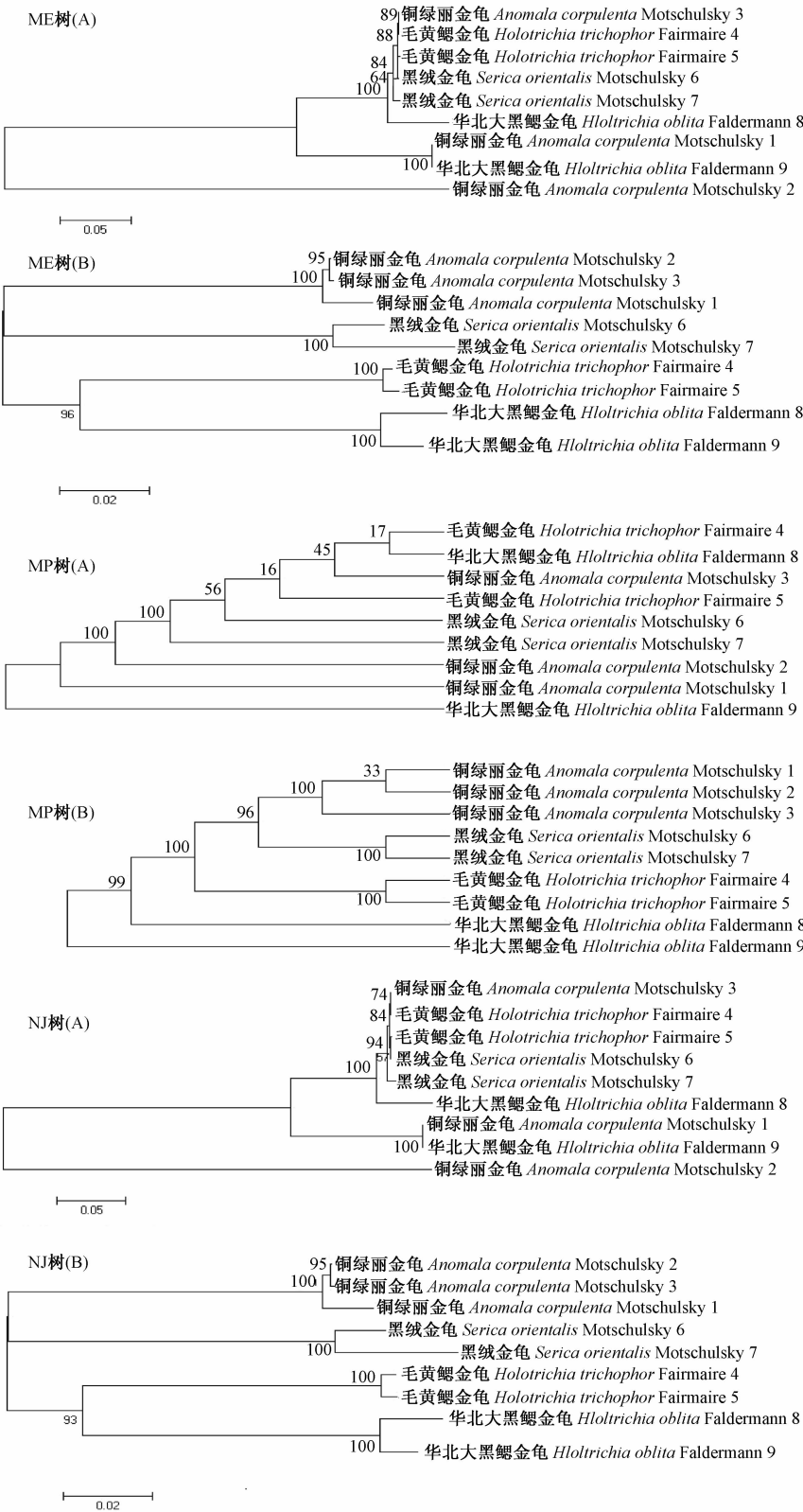


图 3 通用引物与特异引物扩增序列构建的 3 种系统发育树

Fig. 3 Three kinds of phylogenetic trees which constructed by sequences amplified with universal primer and specific primer

注: A、B 分别为通用引物扩增序列与特异引物扩增序列构建系统发育树。
The A and B represent phylogenetic trees that are constructed by sequences amplified with universal primer and specific primer.

好的反应出来,能准确地进行金龟子分子分类。通用引物扩增序列分析的结果与形态分类学分析的结果相差较远。

金龟子的分类利用分子手段势在必行,这就需要我们经过不断探索研究来寻找更好更合适的方法(Monaghan *et al.*, 2007)。由于 COI 基因在每个生物个体中从出生到死亡都没有变化,所以昆虫幼虫与成虫的基因就应该是相同的(Dasmahapatra and Mallet, 2006),从本试验结果来看,COI 基因可以用来对蛱蝶进行较为准确的分子分类,但对于其它金龟子该特异引物序列是否适用也需进一步的结果验证。

参考文献 (References)

- Ahrens D, Monaghan MT, Vogler AP, 2007. DNA-based taxonomy for associating adults and larvae in multi-species assemblages of chafers (Coleoptera: Scarabaeidae). *Mol. Phyl. Evol.*, 44(1):436 – 449.
- Ahrens D, Vogler AP, 2008. Towards the phylogeny of chafers (Sericini): analysis of alignment-variable sequences and the evolution of segment numbers in the antennal club. *Mol. Phyl. Evol.*, 47(2):783 – 798.
- Agusti N, Bourguet D, Spataro T, Delos M, Eychenne N, Folcher L, Arditi R, 2005. Detection, identification and geographical distribution of European corn borer larval parasitoids using molecular markers. *Mol. Ecol.*, 14:3267 – 3274.
- Antonia GC, Wink M, Csaba C, Pop VV, 2007. Application of 16S, 18S rDNA and COI sequences in the molecular systematics of the earthworm family Lumbricidae (Annelida: Oligochaeta). *Soil Biol. Biochem.*, 43:S43 – S52.
- Ball SL, Armstrong KF, 2006. DNA barcodes for insect pest identification: a test case with tussock moths (Lepidoptera: Lymantriidae). *Can. J. For. Res.*, 36:337 – 350.
- Brower AVZ, 2006. Problems with DNA barcodes for species delimitation: ‘ten species’ of *Astrartes fulgurator* reassessed (Lepidoptera: Hesperidae). *Syst. Biodiv.*, 4: 127 – 132.
- Clare EL, Lim BK, Engstrom MD, Eger JL, Hebert PDN, 2007. DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. *Mol. Ecol. Notes*, 7:184 – 190.
- Cognato AI, 2006. Standard percent DNA sequence difference for insects does not predict species boundaries. *J. Econ. Entomol.*, 99:1037 – 1045.
- Dasmahapatra KK, Mallet J, 2006. DNA barcodes: recent successes and future prospects. *Heredity*, 97:254 – 255.
- DeSalle R, Egan MG, Siddall M, 2005. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 360:1905 – 1916.
- Ekrem T, Willassen E, Stur E, 2007. A comprehensive DNA sequence library is essential for identification with DNA barcodes. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 43:530 – 542.
- Elias M, Hill RI, Willmott KR, Dasmahapatra KK, Brower AVZ, Mallet J, Jiggins CD, 2007. Limited performance of DNA barcoding in a diverse community of tropical butterflies. *Proc. R. Soc. B*, 274:2881 – 2889.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotech.*, 3:294 – 299.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR, 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 270 (1512):313 – 321.
- Monaghan MT, Inward DJG, Hunt T, Vogler AP, 2007. A molecular phylogenetic analysis of the Scarabaeinae (dung beetles). *Mol. Phyl. Evol.*, 45(2):674 – 692.
- Pfenninger M, Nowak C, Kley C, Steinke D, Streit B, 2007. Utility of DNA taxonomy and barcoding for the inference of larval community structure in morphologically cryptic *Chironomus* (Diptera) species. *Mol. Ecol.*, 16 (9):1957 – 1968.
- 方晨晨,郭晓华,刘广纯,张卓,2012. 基因序列在金龟总科(Scarabaeoidea)分子系统学研究中的应用. 应用昆虫学报, 49(4):1048 – 1055.
- 高金声,章有为,刘广瑞,冯晋生,1987. 山西金龟子区系研究. 山西农业科学, 3:6 – 14.
- 顾耘,王思芳,张迎春,2002. 东北与华北大黑鳃金龟分类地位的研究. 昆虫分类学报, 24(3):180 – 185.
- 赖小平,赵树进,陈念,2010. DNA 条形码的原理和应用. 中国中医药出版社. 141 – 142.
- 刘勇,宋毓,李晓宇,2010. 基于线粒体 COI 基因的 DNA 条形码技术在昆虫分子鉴定中的应用. 植物检疫, 2:46 – 50.
- 魏鸿钧,1985. 中国地下害虫. 上海:上海科技出版社. 1 – 444.