

rDNA - ITS2 应用于赤眼蜂分子鉴定的研究

李正西* 沈佐锐

(中国农业大学 植物保护学院, 北京 100094)

摘要 本研究通过对拟澳洲赤眼蜂 *Trichogramma confusum*、甘蓝夜蛾赤眼蜂 *T. brassicae*、广赤眼蜂 *T. evanescens*、食胚赤眼蜂 *T. embryophagum*, 及松毛虫赤眼蜂 *T. dendrolimi* 的 6 个地理种群的 rDNA - ITS2 进行克隆测序, 又运用软件 DNA Star 的 MegAlign 程序对不同赤眼蜂属间、赤眼蜂属种间、同种不同地理种群之间以及同一赤眼蜂个体不同拷贝之间的 ITS2 序列的遗传分歧及相似性进行了分析。结果表明: 赤眼蜂属与外群 ITS2 序列的遗传相似性很低, 赤眼蜂属内不同种之间 ITS2 序列保守性适中, 种内或不同地理种群之间以及同一个体不同 ITS2 拷贝间非常保守。说明 ITS2 序列可作为赤眼蜂种级水平分类鉴定的良好靶标序列。

关键词 赤眼蜂; rDNA - ITS2; 分子鉴定

中图分类号 S476.3

Application of rDNA - ITS2 to Molecular Identification of *Trichogramma* spp

Li Zhengxi Shen Zuorui

(College of Plant Protection, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract The internal transcribed spacer 2s (ITS2) of ribosomal DNA of *Trichogramma confusum*, *T. brassicae*, *T. evanescens*, *T. embryophagum* and 6 geographically populations of *T. dendrolimi* are cloned and sequenced. The identity and variation of ITS2 sequences between genera, species, and populations, and copies within an individual were then analyzed by bio-software DNA Star. The results showed that the ITS2 identity between the genera of *Trichogramma* and outgroup was very low, whereas the ITS2 sequences between species of *Trichogramma* were moderately conserved. Our results also manifested that the ITS2s at intraspecific level or within an individual of *Trichogramma* were very conserved. These results suggested that ITS2 is a reasonable target region for molecular identification of *Trichogramma* spp.

Key words *Trichogramma*; internal transcribed spacer 2 of ribosomal DNA; molecular identification

赤眼蜂属(*Trichogramma* Westwood)是世界上防治对象最多、应用面积最广的天敌昆虫, 是赤眼蜂科 Trichogrammatidae 的模式属, 大多数种寄生于鳞翅目昆虫卵内。但其幼期和成虫形态特征甚难区分, 加上寄主所诱导的生理学和形态学变异以及赤眼蜂存在的产雌孤雌

收稿日期: 2002-01-07

* 李正西, 讲师, 博士, 研究方向为昆虫分子生态学。北京圆明园西路 2 号

生殖方式,使分类鉴定一直存在不少疑难问题^[1]。赤眼蜂传统分类方法一般以雄性外生殖器作为鉴定种类的依据^[2],如林乃铨据此共记述我国赤眼蜂科 41 属 142 种^[3],但庞雄飞^[4]提出其中 5 种赤眼蜂,即广赤眼蜂、螟黄赤眼蜂、拟澳洲赤眼蜂、澳洲赤眼蜂和稻螟赤眼蜂之分类争议问题。虽然我国赤眼蜂的应用处于国际先进行列,但基础研究尚需加强,如:确认赤眼蜂种类的快捷方法、监测赤眼蜂产品的生产、监控赤眼蜂的田间生防效果以及选育蜂种优良品系等等。

近年来分子生物学技术的进展可为上述问题的解决提供新的途径。分子鉴定通过构建具有分类意义的分子标记对物种、种群乃至品系进行分型鉴别,其技术基础是探针或引物技术以及靶标基因的定位、扩增、测序及特异引物的设计和筛选。分子标记多种多样,关键是选择符合应用目的的标记类型。rDNA 是真核细胞中最为保守的结构基因^[5],其不同区段进化速率存在差异,若能定位 rDNA 中的“属保守”和“种保守”序列,并以其为引物,就有可能通过 PCR 扩增进行属、种甚至品系或生物型特异性的扩增。本研究对来自国内外多种赤眼蜂及其地理种群之核糖体核糖核酸基因第二内部转录区(rDNA-ITS2)进行了克隆测序,分析了不同赤眼蜂属间、种间、地理种群之间 ITS2 序列以及个体内部不同 ITS2 拷贝之间的遗传分歧和相似性,为进一步构建不同蜂种的快速分子鉴定和检测技术提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 供试虫源

本研究采用的赤眼蜂样本均经过庞雄飞教授和林乃铨教授的形态学鉴定(表 1),饲养及样品处理见参考文献[6]。饲养条件:25℃/昼夜,12 L 12 D,RH 70%~80%。成蜂羽化后,将活虫分多头和单头分装于 1.5 mL 消毒微量离心管中,迅速置-80℃冰箱保存待用。

1.2 主要分子生物学试剂

T 载体试剂盒 pGEM-T Vector System 1 DNA 快速纯化试剂盒 Wizard PCR Preps DNA Purification System 及内切酶 *Bst* I 均为 Promega 公司产品; *Taq* 酶为 GBCOBR L (巴西) 产品;自动测序和引物合成委托上海生物工程公司完成;亚克隆受体菌为 *E. coli* DH5 α 蛋白酶 K 和 dNTP 混合液为 MBI 公司产品。

1.3 DNA 提取、PCR 扩增及电泳

DNA 提取、PCR 扩增及电泳^[6]:样品研碎后加适量 SDS(终浓度为 1%)和蛋白酶 K,置 56℃ 水浴 2 h,接着 95~99℃ 加热 10 min 使蛋白酶 K 失活。扩增 ITS2 区段的引物为:forward-ITSN 2.5'-TTC TCG CAT CGA TGA A GA ACG-3' 和 reverse-ITSB 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'。PCR 循环为 95℃ 变性 3 min,接着进行 32 个循环:94℃ 变性 1 min,50℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 2 min,最后 72℃ 延伸 7 min,置 4℃ 保存。PCR 产物用 1% 琼脂糖 (Spanish) 凝胶电泳分离,溴化乙锭 (EB) 染色。

1.4 ITS2 片段克隆测序

采用 DNA 快速纯化试剂盒回收 PCR 产物,每样收集 25 μ L。亚克隆连接反应、热激转化和蓝白斑筛选都参考分子克隆实验指南^[7]。阳性克隆鉴定采用 *Bst* I(其酶切位点位于 T7 端 31 碱基位和 SP6 端 62 碱基位)。将阳性克隆菌液冷冻后交上海生物工程公司自动测序。为了研究赤眼蜂单个个体内部 ITS2 不同拷贝间的序列差异,可将同一板(来自同一个体的 DNA) 多个阳性克隆测序。

1.5 序列分析

先将所测得的 ITS2 序列在 GenBank 中作 BLAST 搜索, 利用核酸序列分析软件 DNA-MAN V4.0 (Lynnon BioSoft) 对序列进行排序剪裁, 留下两端的保守序列作标记。然后使用 DNA Star 的 MegAlign 模块 (DNA STAR Inc.) 对赤眼蜂属种间、地理种群内以及同一个体不同拷贝间之 ITS2 序列的遗传分歧及遗传相似性进行分析。外群是尤氏赤眼蜂属的模式种 *U. scana sensu stricto* (U SU 74608)。

2 结果

2.1 赤眼蜂 ITS2 序列

本研究所测定之不同赤眼蜂种群之 ITS2 全序列已在 GenBank 注册 (表 1)。

表 1 不同赤眼蜂种及地理种群 ITS2 全序列 GenBank 登录号列表

赤眼蜂种群	来源	GenBank 登录号 (Accession No.)
<i>T. confusum</i>	吉林省长春市	AF422845
<i>T. evanescens</i>	联邦德国哈桑实验室	AF453563—AF453565
<i>T. brassicae</i>	北京市延庆县	AF453566—AF453567
<i>T. anbryophagum</i>	联邦德国哈桑实验室	AF453562
<i>T. dendrolimi</i> TdCN XZ	陕西省长安县	AF453560
<i>T. dendrolimi</i> TdCN YBL	吉林省长春市	AF453561
<i>T. dendrolimi</i> TdCN GZ	广东省广州市	AF453555—AF453557
<i>T. dendrolimi</i> TdCN JL	吉林省仁和市	AF453558
<i>T. dendrolimi</i> TdCN RH	江苏省徐州市	AF453559
<i>T. dendrolimi</i> TdCN CHA	黑龙江省亚布力	AF453554

2.2 赤眼蜂属间和种间 ITS2 序列相似性分析

采用 DNA STAR 的 MegAlign 模块, 基于 CLUSTAL 算法, 对赤眼蜂属各种与外群进行 ITS2 序列相似性分析和聚类 (表 2), 数据显示: 外群与赤眼蜂属种之间的遗传分歧最大, 而遗传相似性最小。

表 2 赤眼蜂属 5 种及其与外群间的遗传分歧和相似性

赤眼蜂种	<i>T. confusum</i>	<i>T. dendrolimi</i>	<i>T. anbryophagum</i>	<i>T. evanescens</i>	<i>T. brassicae</i>	<i>U. scana</i> sp.
<i>T. confusum</i>	—	66.8	67.8	73.7	71.2	29.0
<i>T. dendrolimi</i>	12.6	—	66.4	67.4	70.1	28.0
<i>T. anbryophagum</i>	36.3	33.8	—	60.6	70.5	21.9
<i>T. evanescens</i>	10.8	16.0	44.5	—	70.5	27.3
<i>T. brassicae</i>	11.1	9.7	35.0	11.7	—	27.8
<i>U. scana</i> sp. (外群)	100.1	105.9	112.8	104.6	106.8	—

注: 对角线以上为遗传相似性, 对角线以下为遗传分歧。下同。

聚类结果 (图 1) 表明: 外群与赤眼蜂属种类被分成 2 大类, 而食胚赤眼蜂与其他赤眼蜂属种类缘系较远, 松毛虫赤眼蜂、拟澳洲赤眼蜂、广赤眼蜂和甘蓝夜蛾赤眼蜂共同形成一簇, 缘系较近。

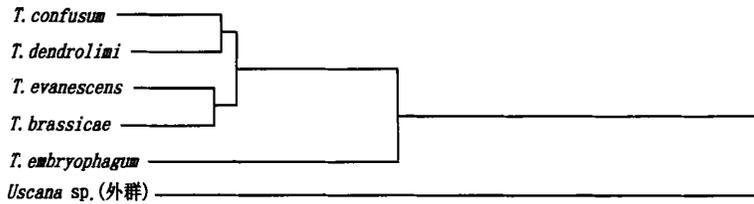


图 1 赤眼蜂属 5 种与外群基于 ITS2 之聚类图(Clustal 算法)

2.3 赤眼蜂种内或地理种群之间 ITS2 序列相似性分析

采用上述软件, 基于 CLUSTAL 算法, 对松毛虫赤眼蜂地理种群之间进行 ITS2 序列相似性分析(表 3), 表明地理种群之间的 ITS2 序列相似性极高(大多在 96% 以上)。

表 3 松毛虫赤眼蜂 6 个地理种群的遗传分歧和相似性

地理种群	TdYBL (亚布力)	TdGZ (广州)	TdJL (吉林)	TdRH (仁和)	TdXZ (徐州)	TdCHA (长安)
TdYBL (亚布力)	—	98.0	97.8	99.3	99.8	97.8
TdGZ (广州)	0.7	—	96.1	98.3	97.8	99.8
TdJL (吉林)	1.0	0.7	—	98.5	97.5	95.9
TdRH (仁和)	0.7	0.5	0.2	—	99.0	98.0
TdXZ (徐州)	0.2	1.0	1.2	1.0	—	97.5
TdCHA (长安)	1.0	0.2	1.0	0.7	1.2	—

2.4 赤眼蜂单一个体的不同 ITS2 拷贝间序列相似性分析

采用上述相同软件, 基于 CLUSTAL 算法, 对赤眼蜂单一个体内不同 ITS2 拷贝间进行序列相似性分析和聚类(表 4), 显示个体内不同 ITS2 拷贝间的序列相似性极高(大多在 96% 以上), 与种群内(同一种)不同个体间 ITS2 序列相似性没有显著区别。

表 4 3 种赤眼蜂单一个体的不同 ITS2 拷贝间相似性及遗传分歧(算法)

克隆株	广赤眼蜂 YQ03	甘蓝夜蛾赤眼蜂 GER2	松毛虫赤眼蜂 GZ1	松毛虫赤眼蜂 GZ2	松毛虫赤眼蜂 GZ3	广赤眼蜂 YQ01	广赤眼蜂 YQ02	甘蓝夜蛾赤眼蜂 GER1
广赤眼蜂 YQ03	—	75.4	67.7	67.0	67.0	100.0	93.5	70.5
甘蓝夜蛾赤眼蜂 GER2	10.7	—	70.8	68.1	68.1	75.4	69.1	96.1
松毛虫赤眼蜂 GZ1	14.0	8.7	—	98.8	98.8	67.7	65.3	70.4
松毛虫赤眼蜂 GZ2	13.9	8.6	0.0	—	100.0	67.0	64.6	68.1
松毛虫赤眼蜂 GZ3	13.9	8.6	0.0	0.0	—	67.0	64.6	68.1
广赤眼蜂 YQ01	0.0	10.7	14.0	13.9	13.9	—	93.5	70.5
广赤眼蜂 YQ02	2.1	12.1	16.6	16.4	16.4	2.1	—	74.6
甘蓝夜蛾赤眼蜂 GER1	11.0	0.2	9.0	8.9	8.9	11.0	12.3	—

3 结论与讨论

从本研究结果可以获得以下基本结论:

1) 赤眼蜂属各种与外群基于 ITS2 序列的同源性接近随机水平(25% 左右), 同时 CLUSTAL 聚类将赤眼蜂属与外群分成明显的 2 大类, 说明 ITS2 变异速率较高, 因此在属之间可能难以找到共同的 ITS2 保守区段用于属特异引物的设计;

2) 赤眼蜂属不同种之间表现出一定的 ITS2 序列保守性(60% ~ 75% 之间), 变异速率适中, 因此一方面能找到赤眼蜂属不同种的共同 ITS2 保守区段, 用于赤眼蜂属的特异引物设计, 另一方面又能基于属内种间 ITS2 序列差异设计不同种的特异引物, 从而构建赤眼蜂种快速鉴定和检测技术体系;

3) 赤眼蜂种内或不同地理种群之间 ITS2 非常保守(95.9% ~ 99.8% 之间), 其保守程度与同一个体内不同 ITS2 拷贝间的保守性(93.5% ~ 100% 之间)没有显著差异。

因此更进一步证明设计赤眼蜂种的特异引物是完全可行的, 但同时无法找到足够大的种内 ITS2 序列差异用于品系间的分子鉴定, 说明 ITS2 序列只能作为赤眼蜂种一级水平分类鉴定的良好靶标序列。

在赤眼蜂近缘种的分子鉴别方面, 国外报道了利用 RAPD 技术鉴别微小寄生蜂的遗传多态性^[8], 但任意引物的筛选较繁琐, 而且 RAPD 本身存在操作的标准化和结果的可重复性问题, 也有研究者通过 rDNA 直接 PCR 扩增来揭示赤眼蜂的遗传多态性^[9], 但直接扩增存在伪带、共迁移和检测的灵敏度问题, 同时很难明确地将不同蜂种区分开, 因此不能实现赤眼蜂种准确、快速的鉴定。本研究通过克隆测序, 并利用核酸序列数据库的共享资源, 发现 rDNA-ITS2 能作为赤眼蜂种级分子鉴定的良好靶标序列, 进一步的研究将在此基础上设计蜂种特异引物, 并通过 PCR 筛选蜂种诊断引物, 最终实现赤眼蜂种的快速鉴定和检测, 促进赤眼蜂的进一步利用。

参 考 文 献

- 1 Stouthamer R, Pinto J D. Taxonomic status of thelytokous forms of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Ann Entomol Soc Am*, 1990, 83: 475~ 481
- 2 Nagarkatti S, Nagarkatti H. Redescription of some known species of *Trichogramma*, showing the importance of male genitalia as a diagnostic character. *Bull Entomol Res*, 1971, 61: 13~ 31
- 3 林乃铨著. 中国赤眼蜂分类(膜翅目: 小蜂总科). 福州: 福建科技出版社, 1994
- 4 庞雄飞. 赤眼蜂属一些种名的商榷. 见: 全国赤眼蜂学术讨论会论文集. 长春: 中国昆虫学会, 1999, 4~ 9
- 5 Besansky N J, Collins F H. The mosquito genome: organization, evolution and manipulation. *Parasitol Today*, 1992, 8: 186~ 192
- 6 李正西, 沈佐锐. 分子标记用于赤眼蜂分子监测的研究. *农业生物技术学报*, 2001, 9(1): 65~ 68
- 7 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T, 等著. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 北京: 科学出版社, 1993
- 8 Landry B S, Dextraze L, Boivin G. Random amplified polymorphic DNA fingerprinting and genetic variability assessment of minute parasitic wasp species (Hymenoptera: Mymaridae and Trichogrammatidae) used in biological control program of phytophagous insects. *Genome*, 1993, 36: 580~ 587
- 9 Orrego C, Silva F A. Genetic variation in the parasitoid wasp *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) revealed by DNA amplification of a section of the nuclear ribosomal repeat. *Florida Entomol*, 1993, 76: 519~ 524