

文章编号: 1674-7054(2016)04-0497-03

粉蚧科无损形态基因组 DNA 提取技术

叶琳雄 符清流 胡 荣 李加慧

(海南大学 环境与植物保护学院, 海口 570228)

摘 要: 以双条拂粉蚧(*Ferrisia virgata* Cockerell) 为研究对象, 采用蛋白酶 K 代替粉蚧玻片标本制作中的 10% KOH 用于组织消化, 消化液用试剂盒法进行基因组 DNA 提取, 剩余虫体进行玻片制作; 同时比较了虫体全研磨、腹部微针扎孔与虫体不做任何处理共 3 种处理方法提取基因组 DNA 的效果。结果表明: 3 种处理方法均可成功提取基因组 DNA, 后 2 种方法处理后的剩余虫体可制作成玻片标本, 实现了粉蚧无损形态的基因组 DNA 提取技术, 为粉蚧的 DNA 条形码和系统发育研究提供了技术保障。

关键词: 粉蚧; 基因组 DNA; 提取; 无损形态; DNA 条形码

中图分类号: S 433.3 文献标志码: A DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2016.04.015

粉蚧隶属半翅目 Hemiptera 粉蚧科 Pseudococcidae, 是一类严重为害农林作物的害虫^[1]。长期以来, 基于粉蚧形态特征分类研究中遇到的复杂情况, 如其形态完整性、受环境因素影响而诱发形态变异^[2], 给粉蚧的鉴定增加了难度。采用分子生物学技术开展昆虫种类鉴定, 不受雌雄性别和发育阶段的限制, 具有简便、快速、高通量等特点。目前, 利用 DNA 片段序列进行粉蚧的分子鉴定和系统发育逐渐得到广泛应用^[3-5]。粉蚧个体小, 目前, 国内学者通常采用整头粉蚧或切取部分虫体组织加液氮研磨的方法进行基因组 DNA 的提取^[6-8], 该方法部分或完全破坏了虫体的形态特征, 给后续标本验证和形态学研究带来不便。Philips 和 Simon 利用 DTAB 裂解液对馆藏蟋蟀标本进行组织裂解首次实现了无损形态基因组 DNA 提取^[9]。此后, Knogle 等利用蛋白酶 K 对鳞翅目昆虫腹部进行消化, 并将基因组 DNA 提取技术与生殖器解剖技术^[10]相结合; Bellis 等利用蛋白酶 K 对体型微小的蠓科昆虫整头标本进行消化^[11], 实现了蠓科昆虫的无损形态基因组 DNA 提取; 解萌等亦将此提取法应用在鞘翅目昆虫上^[12]。粉蚧的分类鉴定依赖玻片标本, 制作玻片标本首先需要利用 10% 的 KOH 溶液对虫体内部组织进行消化后进行后续制作流程。玻片标本与基因组 DNA 提取的实验虫体如非同一个体, 极可能影响粉蚧的准确鉴定。本研究利用蛋白酶 K 代替 10% 的 KOH 溶液进行组织消化, 将粉蚧的玻片标本制作与基因组 DNA 提取相结合, 建立粉蚧的无损形态基因组 DNA 提取技术, 解决珍稀标本或检疫部门收集的单头标本形态研究和分子鉴定不能两全的难题, 旨在为粉蚧的分子鉴定和系统发育研究提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 研究材料 供试的双条拂粉蚧(*Ferrisia virgata* Cockerell) 采自海南省文昌市南阳镇隔离农场, 标本采集后放入无水酒精保存, 返回实验室后更换球酒精, 于 -20 ℃ 保存。选取个体大小相近的粉蚧 9 头, 3 头为 1 组, 分别进行 3 种提取前处理: A. 整头粉蚧研磨; B. 解剖镜下用微针在虫体腹部中央扎 1 个小孔; C. 虫体不做前期处理整头标本直接进行组织消化。

1.2 基因组 DNA 提取及质量浓度检测 3 组预处理后的样品利用天根生化科技(北京)有限公司的“血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒”对每头粉蚧分别进行基因组 DNA 提取。提取步骤做如下调整:

收稿日期: 2016-07-13

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201403075); 海南省自然科学基金项目(20163044); 国家自然科学基金项目(31660129); 国家质量监督检验检疫总局科技计划项目(2016IK094)

作者简介: 叶琳雄(1994-), 男, 海南大学环境与植物保护学院 2014 级硕士研究生, E-mail: 445233812@qq.com

通信作者: 李加慧(1984-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 昆虫系统学, E-mail: jiahui.li1984@qq.com

20 μL 蛋白酶 K 56 $^{\circ}\text{C}$ 消化过夜,然后用灭菌的钝头竹签将 B、C 2 组提取前处理的粉蚧挑出,置于凹面皿上用于后续的玻片标本制作。裂解液则参照试剂盒说明书,完成基因组 DNA 的提取。基因组 DNA 提取完成后取 1 μL 提取的样品基因组 DNA 利用 NanoDrop 2000 spectrophotometer 分光光度计(Thermo Fisher Scientific 公司,美国)测定各样品的质量浓度。

1.3 PCR 扩增及测序 选用介壳虫细胞色素氧化酶 I (COI) 基因片段作为分子标记对不同方法提取的基因组 DNA 的质量进行测定。扩增引物参照 Park^[13],目标片段约 650 bp,由深圳华大基因有限公司合成(上游引物序列: PcoF1-5'-CCTTCAACTAATCATAAAAATATYAG-3',下游引物序列: LepR1-5'-TAAACTTCTGGAT-GTCCAAAAAATCA-3')。PCR 反应总体积为 20 μL : 模板 DNA 1 μL , *Taq* DNA 聚合酶(5 U $\cdot$ μL^{-1}) 0.2 μL , dNTPs(2.5 mol $\cdot$ L^{-1}) 1 μL , 上、下游引物(10 pmol $\cdot$ L^{-1}) 各 1 μL , 10 $\times$ PCR Buffer 2 μL , ddH₂O 13.8 μL 。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 循环 40 次; 循环结束后, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。PCR 产物利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,并委托深圳华大基因有限公司进行 PCR 产物纯化和双向测序。

1.4 玻片标本制作及基于形态的物种鉴定 将组织消化后的虫体在解剖镜下观察,参照曾思海等的方法制作粉蚧永久性载玻片^[14],在显微镜下基于形态特征进行物种鉴定并进行拍照。

2 结果与分析

2.1 不同处理方法提取基因组 DNA 的效果 NanoDrop2000 超微量分光光度计检测结果表明: 整只粉蚧研磨后组织消化提取的基因组 DNA 质量浓度最高,平均为 99.9 mg $\cdot$ L^{-1} ; 腹部微针扎孔处理后进行组织消化提取的基因组 DNA 质量浓度平均为 64.7 mg $\cdot$ L^{-1} ; 不进行前期处理直接完整虫体组织消化后提取的基因组 DNA 平均质量浓度 41.5 mg $\cdot$ L^{-1} 。从图 1 可知,所有个体均成功扩增,且扩增条带均一、清晰。所有个体均能成功测序,序列经过拼接后与 GENBANK 和生物条形码数据库(BOLD)中的序列进行序列比对,结果显示与 GENBANK 数据库中的双条拂粉蚧的 COI 基因序列(Accession number: HQ179887)相似度为 100%,经 BOLD 数据库鉴定为双条拂粉蚧(BOLD: AAJ0375)的可能性为 100%。

2.2 永久性玻片标本 用微针扎孔和不进行前期处理利用蛋白酶 K 组织消化后虫体均可制作成永久性玻片标本,且其外部形态特征保存完整,结构清晰(图 2)。

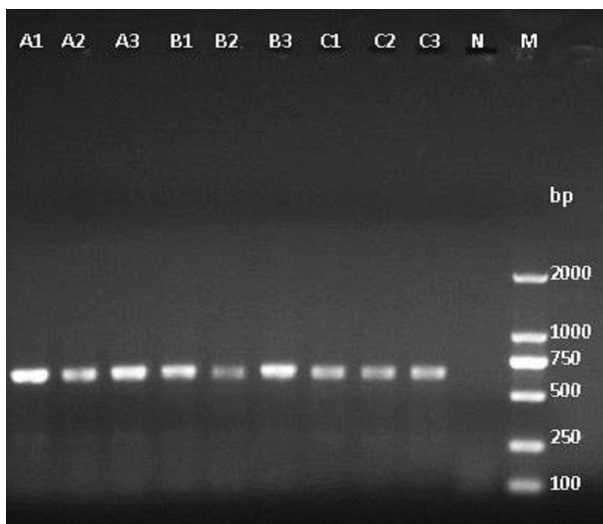


图 1 双条拂粉蚧 COI 基因的 PCR 扩增产物电泳图

A1~A3: 整头粉蚧研磨处理; B1~B3: 腹部微针扎孔处理;
C1~C3: 未做前期处理; N: 阴性对照; M: DNA marker

Fig. 1 Electrophoregram of the PCR products of COI gene of *Ferrisia virgata*

A1~A3: Treatment of grinding the whole body; B1~B3: Treatment of pricking with micropins; C1~C3: No treatment; N: Negative control; M: DNA Marker

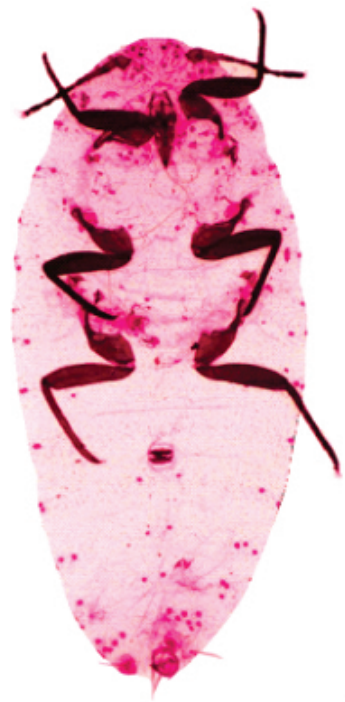


图 2 双条拂粉蚧永久性玻片标本的形态

Fig.2 Morphology of *Ferrisia virgata* mounted on slide

3 讨 论

粉蚧科昆虫的系统发育学研究中存在诸多分歧,通常需要结合传统形态学鉴定和分子生物学研究^[15]。本研究的无损形态基因组 DNA 提取法将传统的粉蚧玻片标本的制作与基因组 DNA 的提取结合起来,既可以将粉蚧制作成永久性玻片标本,又可以实现基因组 DNA 的提取,可以解决单头粉蚧标本形态研究和分子生物学研究不能两全的难题,为粉蚧科昆虫的 DNA 条形码研究和系统发育研究提供技术保障。此外,该方法简单实用,对于基层农科单位和检疫部门粉蚧的分子鉴定具有较强的应用价值。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] COX J M. An experimental study of morphological variation in mealybugs (Homoptera: Coccoidea: Pseudococcidae) [J]. Systematic Entomology, 1983, 8(4): 361–382.
- [3] BEUNING L, MURPHY P, WU E, BATCHELOR T, et al. Molecular-based approach to the differentiation of mealybug (Hemiptera: Pseudococcidae) species [J]. Journal of Economic Entomology, 1999, 92(2): 463–472.
- [4] 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.
- [5] 魏亦寒, 郑斯竹, 蔡平, 等. 分子生物学技术在蚧虫分类鉴定中的应用 [J]. 环境昆虫学报, 2015, 37(4): 871–882.
- [6] 何衍彪, 万宣伍, 詹儒林, 等. 基于 DNA 序列的 12 种粉蚧亲缘关系分析 [J]. 热带作物学报, 2011, 32(12): 2324–2330.
- [7] 赵静, 孙洋, 谭永安, 等. 基于 COI 及 28S rDNA 序列分析的扶桑绵粉蚧地理种群的遗传分化研究 [J]. 棉花学报, 2014, 26(2): 130–137.
- [8] 田虎, 李小凤, 万方浩, 等. 利用种特异性 COI 引物(SS-COI) 鉴别扶桑绵粉蚧 [J]. 昆虫学报, 2013, 56(6): 689–696.
- [9] Phillips A J, SIMON C. Simple, efficient and nondestructive DNA extraction protocol for Arthropods [J]. Annals of the Entomological Society of America, 1995, 88(3): 281–283.
- [10] Knolke S, ERLACHER S, HAUSMANN A, et al. A procedure for combined genitalia dissection and DNA extraction in Lepidoptera [J]. Insect Systematics & Evolution, 2004, 35(35): 401–409.
- [11] Bellis G A, DYCE A L, GOPURENKO D, et al. Revision of the Immaculatus Group of Culicoides Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) from the Australasian Region with description of two new species [J]. Zootaxa, 2013, 3680(1): 15–37.
- [12] 解萌, 侯清柏, 梁醒财. 卷象科昆虫无损形态的 DNA 提取方法 [J]. 昆虫知识, 2008, 45(3): 491–493.
- [13] Park D S, SUH S J, HEBERT P D N, et al. DNA barcodes for two scale insect families, mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) and armored scales (Hemiptera: Diaspididae) [J]. Bulletin of Entomological Research, 2011, 101(4): 429–434.
- [14] 曾思海, 陈劲松. 结合显微镜制作蚧壳虫永久性玻片标本的方法 [J]. 植物检疫, 2012, 26(3): 34–35.
- [15] Cook L G, GULLAN P J, TRUEMAN H E. A preliminary phylogeny of the scale insects (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea) based on nuclear small-subunit ribosomal DNA [J]. Molecular Phylogenetics & Evolution, 2002, 25(1): 43–52.

Extracting of Genomic DNA from Mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) Without Conferring External Morphological Damage

YE Linxiong, FU Qingliu, HU Rong, LI Jiahui

(College of Environment and Plant Protection, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: Mealybug *Ferrisia virgata* Cockerell was digested with Proteinase K solution rather than 10% KOH to extract its genomic DNA. *F. virgata* was pretreated before extraction by grinding the whole mealybug, pricking the mealybug with micro-pins on abdomen or without any treatment to the mealybug. Genomic DNA was extracted by the digestion kit following its directions, and the rest of the mealybug left after digestion was used for slide preparation. The results show genomic DNA was extracted from the mealybug with all the three pre-treatments and that the rest of the mealybug left in the latter two pretreatments was good to make slides. This is a new protocol for genomic DNA extraction combined with permanent slides mounting in mealybugs. It would be useful for DNA barcoding and systematic research of mealybugs.

Keywords: mealybugs; genomic DNA; extraction; no morphological damage; DNA barcodes