

采用实时荧光环介导等温扩增检测方法鉴定茶黄硬蓟马

Identification of chilli thrips *Scirtothrips dorsalis* based on a real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification protocol黄丽莉¹ 李茵² 刘英² 彭徽² 寇海群^{1*}

(1. 豫章师范学院生态与环境系, 江西南昌 330103; 2. 南昌海关技术中心, 南昌 330002)

Huang Lili¹ Li Yin² Liu Ying² Peng Hui² Kou Haiqun^{1*}

(1. Department of Ecology and Environment, Yuzhang Normal University, Nanchang 330103, Jiangxi Province, China;

2. Technological Centre of Nanchang Customs, Nanchang 330002, Jiangxi Province, China)

茶黄硬蓟马 *Scirtothrips dorsalis* 又名茶黄蓟马、小黄蓟马、脊丝蓟马, 属缨翅目蓟马科硬蓟马属。与重要入侵害虫西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* 相似(Reitz et al, 2020), 除直接为害外, 茶黄硬蓟马还可通过传播植物病毒进行间接为害(Kumar et al., 2013)。目前已有欧洲和地中海植物保护组织(European and Mediterranean Plant Protection Organization, EPPO)、加拿大和新西兰等地区与国家将其列入检疫性有害生物名单, 其对全球贸易造成了较大影响。目前茶黄硬蓟马的识别鉴定方法包括形态学鉴定与以普通PCR为主的分子鉴定方法, 但形态学鉴定方法由于其体型微小、与近似种区别特征不明显对鉴定人员专业性要求高, 且对未成熟阶段还无法鉴定; 以普通PCR为主的分子鉴定方法程序繁琐, 对环境条件要求高, 所需时间长, 不适合田间监测及口岸检疫等现场使用。为探索一种操作简便、对环境设施设备要求不高, 适用于田间早期监测或口岸检疫操作的现场快速检测方法, 本研究拟采用实时荧光环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)检测方法对茶园中茶黄硬蓟马进行快速鉴别, 以期为进出口农产品快速通关与明确田间防控最佳防治时期提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试虫源: 茶黄硬蓟马广东惠州、江西南昌和江西赣州种群及茶园中常见的色蓟马 *Thrips coloratus*、淡色蓟马 *T. flavus*、烟蓟马 *T. tabaci* 和丽花蓟马 *F. intonsa* 若虫和成虫于2018—2019年自各地茶园采集并经形态学鉴定后, 于无水乙醇中-80℃下保

存, 待提取DNA。

试剂及仪器: DNA提取试剂盒, 日本TaKaRa公司; Isothermal Master Mix试剂, 英国OptiGene公司; 其他试剂均为国产分析纯。Genie II等温扩增荧光检测系统, 英国OptiGene公司。

1.2 方法

实时荧光LAMP检测方法引物设计与合成: 根据GenBank上茶黄硬蓟马基因序列(GenBank登录号为AB063343.1), 经与其他蓟马科ITS2基因序列进行比对分析, 使用Primer Premier 5.0软件进行实时荧光LAMP检测引物设计, 筛选出实时荧光LAMP检测方法正反向内引物FIP(5'-GCGGAGACTCCAATCTCGTCACTCAACGACCAGACTGT-3')/BIP(5'-CTCACGGCGTGGTACTCTTAATTCCGTGCGCATATC-3')、正反向外引物F3(5'-GGCCACACCTGACTGA-3')/B3(5'-CAAGCGAACGAGACAGT-3')和正反向环引物LoopF(5'-CGCCACGAGTGACACA-3')/LoopB(5'-AAAGTGAGTGTGGCTCG-3')。引物序列均由宝生物工程(大连)有限公司合成。

实时荧光LAMP检测方法: 将茶黄硬蓟马转移到滴有10 μL裂解液TNES(Tris、NaCl、乙二胺四乙酸配制的混合物)的载玻片上, 采用无菌微针对蓟马腹部进行穿刺, 将刺过的蓟马放入装有10 μL裂解液TNES的2 mL离心管中, 吸取40 μL裂解液TNES冲洗载玻片上放蓟马的位置, 并将其吸入离心管中作为样本模板。按照DNA提取试剂盒说明书提取DNA模板。以DNA模板或者虫体进行PCR扩增, 每种蓟马各检测1头。25 μL PCR扩增反应体

系: Isothermal Master Mix 15 μL 、5 $\mu\text{mol/L}$ 正反向引物各 1 μL 、40 $\mu\text{mol/L}$ 正反向内引物各 1 μL 、20 $\mu\text{mol/L}$ 正反向环引物各 1 μL 、样本模板 2 μL 、加 ddH₂O 补足至 25 μL 。PCR 扩增程序: 63 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min, 反应温度升高至 98 $^{\circ}\text{C}$, 以 0.05 $^{\circ}\text{C/s}$ 的速度降温至 80 $^{\circ}\text{C}$ 作熔解曲线, 反应约 5 min 终止反应。

实时荧光 LAMP 检测方法引物的特异性检测: 以设计的实时荧光 LAMP 检测方法引物为引物, 采用实时荧光 LAMP 检测方法在 Genie II 等温扩增荧光检测系统上分别对茶园中 5 种常见蓟马成虫虫体、茶黄硬蓟马虫体与 DNA、茶黄硬蓟马若虫虫体与成虫虫体进行扩增和检测, 体系和方法同上。

普通 PCR 特异性检测: 采用茶黄硬蓟马专化引物 sdi-16F (5'-GCTTGGATCTGATGGCAAC-3')/sdi-20R (5'-TGTGCACACGAGCCGCTCGC-3') 进行普通 PCR 反应。25 μL PCR 反应体系: 10 \times PCR 反应缓冲液 2.5 μL 、25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL 、dNTPs 2 μL 、Taq DNA 聚合酶 1 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各 1 μL 、DNA 模板 2 μL 、加灭菌水至终体积 25 μL 。普通 PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 10 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环 35; 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 10 min。

2 结果与分析

2.1 实时荧光 LAMP 检测方法引物特异性检测

用建立的实时荧光 LAMP 检测体系对供试蓟马样品进行检测, 只有茶黄硬蓟马扩增结果为阳性, 其他 5 种常见蓟马和空白对照扩增结果为阴性, 且与茶黄硬蓟马普通 PCR 检测结果一致。

2.2 实时荧光 LAMP 检测方法检测

5 种常见蓟马经实时荧光 LAMP 检测方法检测后, 只有 3 个茶黄硬蓟马样品有扩增, 出峰时间均在 600 s 左右, 分别为 600、630 和 615 s, 熔解温度介于 89.6~90.6 $^{\circ}\text{C}$ 之间 (图 1), 表明该方法的特异性好, 与采用普通 PCR 检测方法的检测结果一致。

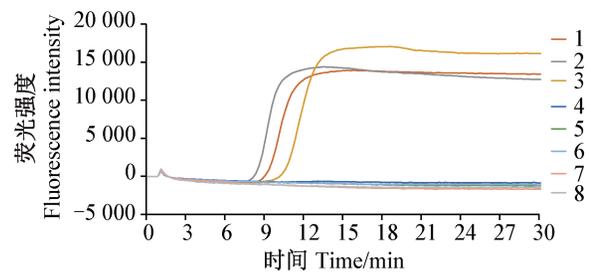
茶黄硬蓟马虫体和 DNA 经实时荧光 LAMP 检测方法检测后, 茶黄硬蓟马 DNA 出峰时间分别为 480 s 和 540 s, 茶黄硬蓟马虫体的出峰时间分别为 660 s 和 825 s, 熔解温度介于 89.4~89.8 $^{\circ}\text{C}$ 之间, 检测鉴定结果一致。

茶黄硬蓟马若虫虫体与成虫虫体经实时荧光 LAMP 检测方法检测后, 3 头茶黄硬蓟马若虫虫体出峰时间分别为 615、645 和 705 s, 2 头茶黄硬蓟马成虫虫体出峰时间分别为 750 s 和 720 s, 熔解温度介于 83.0~90.2 $^{\circ}\text{C}$ 之间, 检测鉴定结果一致。

3 讨论

本研究筛选的茶黄硬蓟马特异性荧光检测引物

组包含 6 条特异性引物, 可识别靶标序列上的 6 个独立区域, 任何 1 个区域与引物不匹配均不能进行扩增。本研究的检测方法不仅可对茶园中蓟马种类进行区分, 而且还可对茶黄硬蓟马各个虫态进行实时检测, 且耗时少; 直接采用破碎虫体的体液作为模板与提取 DNA 作为模板得到的结果一致。该方法已被用于昆虫、植物病原菌等植物中有害生物快速检测及棕榈蓟马 *T. palmi* 检测中, 在检测棕榈蓟马时也可不提取 DNA 而直接对虫体进行检测 (Przybylska et al., 2015; 胡连霞等, 2017), 只需 1 台等温荧光扩增仪即可完成鉴定, 非常适合在口岸与田间现场推广使用。



1~3: 分别为茶黄硬蓟马广东惠州、江西南昌和江西赣州种群; 4: 色蓟马; 5: 淡色蓟马; 6: 烟蓟马; 7: 丽花蓟马; 8: 空白对照。1~3: GD-HZ, JX-NC and JX-GZ populations of *Scirtothrips dorsalis*, respectively; 4: *Thrips coloratus*; 5: *T. flavus*; 6: *T. tabaci*; 7: *Frankliniella intonsa*; 8: CK.

图 1 茶园中 5 种常见蓟马虫体的实时荧光 LAMP 扩增曲线

Fig. 1 Real-time fluorescence LAMP amplification plot of five common thrips in tea garden

参考文献 (References)

- Hu LX, Zhang D, Zhao DM, Yang ZH, Zhu JH, Qi JM. 2017. A real-time fluorescence quantitative loop mediated isothermal amplification for detection blackleg pathogen in potato tubers. *Journal of Plant Protection*, 44(5): 863-864 (in Chinese) [胡连霞, 张岱, 赵冬梅, 杨志辉, 朱杰华, 戚家明. 2017. 实时荧光定量环介导等温扩增方法检测马铃薯黑胫病菌. *植物保护学报*, 44(5): 863-864]
- Kumar V, Kakkar G, Cindy L, Dakshina R, Lance S. 2013. An overview of chilli thrips, *Scirtothrips dorsalis* (Thysanoptera: Thripidae) biology, distribution and management.//Soloneski S, Larramendy M. *Weed and Pest Control - Conventional and New Challenges*. Rijeka: InTech, pp. 55-77
- Przybylska A, Fiedler Z, Kucharczyk H, Obrepalska-Stepłowska A. 2015. Detection of the quarantine species *Thrips palmi* by loop-mediated isothermal amplification. *PLoS ONE*, 10(3): e0122033
- Reitz SR, Gao YL, Kirk WDJ, Hoddle MS, Leiss KA, Funderburk JE. 2020. Invasion biology, ecology, and management of western flower thrips. *Annual Review of Entomology*, 65: 17-37

(责任编辑:张俊芳)