植物保护学报 Journal of Plant Protection，2022，49(2)：707-708 DOI：10.13802/j.cnki.zwbhxb.2022.2020305

# 基于高分辨率荧光曲线技术鉴别瓜实蝇和南亚果实蝇

# Identification of fruit flies *Bactrocera cucurbitae* and *B. tau* based on high-resolution melting technology

姜建军* 黄立飞 张 晋 王凤英 曹雪梅 杨 朗

（广西壮族自治区农业科学院植物保护研究所，广西作物病虫害生物学重点实验室，南宁 530007）

Jiang Jianjun* Huang Lifei Zhang Jin Wang Fengying Cao Xuemei Yang Lang

（Guangxi Key Laboratory of Biology for Crop Diseases and Insect Pests, Plant Protection Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China）

快速准确识别鉴定害虫，做到“知虫识虫”是对其综合防控治理的前提。瓜实蝇 *Bactrocera cucurbitae* 和南亚果实蝇 *B. tau* 是瓜果蔬菜上2种重要的入侵性农业害虫，这2种害虫在田间的生境和多种寄主均相同（何超等，2019），其幼虫形态相似，难以分辨。因此，在生产上迫切需要寻求简便、快速鉴别这2种害虫的方法。近年来，随着分子生物学技术发展，以分子技术为基础的害虫种类鉴定方法突破了虫态的限制，在实蝇类害虫鉴定中得到广泛应用，如张岳等（2019）以DNA条形码序列为分子标记探究橘大实蝇 *Bactrocera minax* 的20个中国地理种群以及1个印度地理种群间的亲缘关系，结果表明DNA条形码技术可用于实蝇分子鉴定及其种群遗传进化分析。高分辨率熔解曲线（high-resolution melting，HRM）技术是用于基因分型和突变扫描分析的一项荧光定量PCR技术（Wittwer et al.，2003），其具有快捷、准确及产物无需后续处理（如酶切、电泳等）等优点，已在点突变筛选、物种鉴别等方面表现出一定优势，但其在农业害虫鉴定方面未见报道。本研究拟应用HRM技术建立鉴定农业重要害虫瓜实蝇和南亚果实蝇的体系，以期为这2类害虫及其他种类农业害虫的鉴定提供技术参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试昆虫：分别于广西壮族自治区（简称广西）南宁市西乡塘区老口村、海南省海口市福山镇仁里村和广东省广州市广东农业科学院白云基地采集被2种实蝇为害的瓜果带回实验室，即3个地理种群，将其于温度26℃、相对湿度（70±5）%、光周期14 L∶12 D的室内培养，待瓜果内的幼虫老熟后移至沙土中化蛹，待成虫羽化后取部分样品进行形态鉴定，然后分别在75%酒精中浸泡，4℃保存备用；取部分样品在75%酒精中浸泡，4℃保存，用于检测。

试剂和仪器：基因组DNA提取试剂盒，天根生化科技（北京）有限公司；*ExTaq* HS DNA聚合酶、TB Green® Premix Ex *Taq*™ II、DL5000 DNA Marker、pMD™ 20-T载体，日本TaKaRa公司；20×EvGreen染料，上海翊圣生物科技有限公司；其他试剂均为国产分析纯。DYCP-6D电泳仪，北京六一生物科技有限公司；Firereader凝胶成像系统，英国UVITEC公司；NanoDrop-2000C超微量紫外分光光度计，美国赛默飞公司；CFX Connect定量PCR仪，美国Bio-Rad公司。

### 1.2 方法

DNA提取及HRM引物设计：取瓜实蝇和南亚果实蝇成虫各1头，按照基因组DNA提取试剂盒说明书分别提取DNA。根据瓜实蝇和南亚果实蝇线粒体基因组数据（GenBank登录号分别为JN635562和MF966384），采用Primer-BLAST程序设计HRM引物对F（5′-CCTGGTCCTTTCGTACTAAGGTATT-3′）/R（5′-TGATCTGAGTTCAGACCGGC-3′），引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

HRM引物特异性常规PCR检测及测序：25 μL反应体系为10 μmol/L上下游引物各0.5 μL、Ex *Taq* HS聚合酶0.125 μL、10×*Ex Taq* Buffer 2.5 μL、2.5 mmol/L dNTPs 2 μL、50 ng/μL模板DNA 2 μL，灭菌水补足至25 μL。反应程序为95℃预变性3 min；95℃变性15 s，55℃退火15 s，72℃延伸30 s，35个循环；72℃再延伸5 min。2%琼脂糖凝胶电泳检测产

基金项目：国家自然科学基金（31960564），广西农科院科技发展基金（桂农科2021YT068，31960564），广西科技重大专项（桂科AA20108002）
* 通信作者（Author for correspondence），E-mail：jiangjianjun8008@126.com；收稿日期：2020-12-03

物并纯化回收目的片段，克隆、测序。

HRM引物特异性荧光定量PCR检测：10倍梯度稀释DNA模板，根据不同温度梯度下扩增效率确定最佳退火温度，以熔解曲线是否为单峰判断引物的特异性。20 μL反应体系为10 μmol/L上下游引物各0.4 μL、2×TB Green Premix Ex *Taq* II 10 μL、50 ng/μL模板DNA 2 μL，无菌水补足至20 μL。反应程序为95℃预变性30 s；95℃变性5 s，60℃退火30 s，40个循环；循环结束后进行熔解曲线程序。

瓜实蝇和南亚果实蝇熔解曲线HRM-PCR鉴定分析：3个地理种群各随机取24头成虫进行HRM-PCR鉴定分析。20 μL反应体系为10 μmol/L上下游引物各0.4 μL、20×EvGreen染料1 μL、Ex *Taq* HS聚合酶0.1 μL、10×Ex *Taq* Buffer 2 μL、2.5 mmol/L dNTP Mixture 1.6 μL、50 ng/μL模板DNA 2 μL，无菌水补足至20 μL。反应程序为95℃预变性30 s；95℃变性10 s、62.8℃退火30 s，40个循环；循环结束后进行熔解曲线程序，得出归一化熔解曲线或差异化熔解曲线。同时分别设置1组瓜实蝇和南亚果实蝇样本为对照，所有反应均设3个重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 HRM引物特异性检测

常规PCR扩增结果显示，2种实蝇目的片段均为单一条带，长度100 bp左右。克隆测序长度80 bp，2种实蝇的序列均有2个碱基差异。表明设计的引物扩增片段为预期目的片段。荧光定量PCR扩增结果显示，2种实蝇序列的熔解曲线均为单峰，表明设计的引物通用性和特异性较强，同时2种实蝇退火温度相差1.2℃，符合高分辨率溶解荧光曲线区分物种的基本要求，当退火温度为62.8℃时，PCR扩增效率最高，为97.54%。

### 2.2 瓜实蝇和南亚果实蝇HRM-PCR鉴定分析

以扩增效率最高的62.8℃为退火温度进行瓜实蝇和南亚果实蝇高分辨率熔解曲线。2种实蝇均分别同其对照聚为1束，归一化熔解曲线或差异化熔解曲线都能明显区分2种实蝇（图1）。表明HRM-PCR方法能准确区分瓜实蝇和南亚果实蝇。

## 3 讨论

近年来分子手段鉴定物种已成为一种便捷可靠的方法，HRM技术出现至今已有20年，但在农业昆虫方面应用还未见报道。DNA浓度及质量、引物特异性、扩增片段长度和保守性及扩增缓冲液离子浓度等影响HRM结果（Rojas et al.，2021）。本研究建立的HRM体系成功鉴别了果蔬上共寄主为害的2种近缘物种瓜实蝇和南亚果实蝇，这将有助于对2种害虫的快速检疫和识别，能否对非共寄主的形态类似物种进行准确鉴定仍需深入研究。

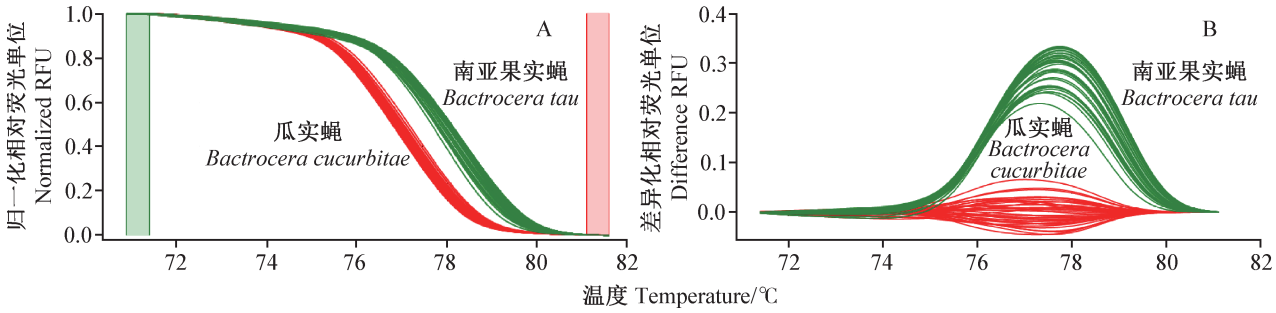


**图1 瓜实蝇和南亚果实蝇的归一化（A）和差异化（B）熔解曲线**

Fig. 1 Normalized melt curves (A) and differential melt curves (B) of *Bactrocera cucurbitae* and *B. tau*

## 参 考 文 献（References）

He C, Kong Q, Yuan SY, Shen DR, Xie K, Wang CM. 2019. Interspecific competition between *Bactrocera tau* and *Bactrocera cucurbitae* on four host plants. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 41(3): 484–490 (in Chinese) [何超, 孔琼, 袁盛勇, 沈登荣, 谢昆, 王传铭. 2019. 南瓜实蝇与瓜实蝇成虫在4种寄主上的产卵竞争. 江西农业大学学报, 41(3): 484–490]

Rojas MF, König GA, Vagnozzi AE, Vera FS, Scolaro LA, Craig MI. 2021. Optimization and application of a high-resolution melting protocol in the characterization of avian infectious laryngotracheitis virus. Revista Argentina de Microbiología, 53(2): 89–97

Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. 2003. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. Clinical Chemistry, 49(6): 853–860

Zhang Y, Zhang JF, Qin YJ, Zeng YY, Li ZH. 2019. Molecular identification of the fruit fly larvae in major citrus production areas in Hunan Province based on DNA barcoding. Journal of Plant Protection, 46(1): 71–81 (in Chinese) [张岳, 张佳峰, 秦誉嘉, 曾译影, 李志红. 2019. 基于DNA条形码技术的湖南省柑橘主产区实蝇幼虫分子鉴定. 植物保护学报, 46(1): 71–81]

（责任编辑：张俊芳）