

禹海鑫,蔡 波,孙民琴,等. 长角天牛属部分种类 DNA 条形码及系统发育的研究[J]. 江苏农业科学,2018,46(23):102–106.  
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2018.23.025

# 长角天牛属部分种类 DNA 条形码及系统发育的研究

禹海鑫<sup>1</sup>, 蔡 波<sup>2</sup>, 孙民琴<sup>1</sup>, 郭骁驹<sup>1</sup>, 杨晓军<sup>3</sup>, 安榆林<sup>3</sup>

(1. 南通出入境检验检疫局, 江苏南通 226004; 2. 海南出入境检验检疫局热带植物隔离检疫中心, 海南海口 570311;

3. 江苏出入境检验检疫局动植物与食品检测中心, 江苏南京 210009)

**摘要:**长角天牛属天牛是严重危害林木的一类蛀干害虫。为了完善长角天牛属线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I (mtDNA *CO I*) 的基因数据库, 研究该属部分种类的遗传进化关系, 并探索利用 *CO I* 基因作为 DNA 条形码鉴别长角天牛种类的可行性。应用巢氏 PCR 技术扩增了 5 种长角天牛标本的 *CO I* 序列, 并与 GenBank 记录的 4 种长角天牛 *CO I* 序列进行对比, 以解析其序列组成变异情况、碱基替换规律和遗传距离差异, 最后再利用 MEGA 5.20 构建系统发育进化树。结果显示, 长角天牛属不同种类间的遗传差异显著, 可将此 DNA 条形码用作长角天牛属不同种类的分

子鉴定依据。

**关键词:**长角天牛; *CO I* 基因; DNA 条形码; 系统发育

**中图分类号:** S412; S433.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2018)23–0102–04

沟胫天牛亚科 (Laniinae) 隶属于鞘翅目 (Coleoptera) 叶甲总科 (Chrysomiloidea) 天牛科 (Cerambycidae), 是天牛科中种类最多的一个亚科。其中, 长角天牛属 (*Acanthocinus*) 天牛是该亚科内极为重要的一类林木蛀干害虫, 可危害鱼鳞松、油松、马尾松、红松、山杨、核桃、栎属等多种针、阔叶树种。该属天牛主要以幼虫钻蛀树木的木质部、韧皮部和边材组织为害, 常使树势衰弱, 危害严重时还会导致树木整株死亡, 给农林业生产造成极大的经济损失<sup>[1]</sup>。截至目前, 该属昆虫在全世界范围内已被描述的种类约有 14 种, 广泛分布于欧洲、非洲北部、俄罗斯、日本、朝鲜、中国台湾等国家和地区。我国已报道的长角天牛属昆虫种类约有 5 种, 包括白带长角天牛 (*A. carinulatus*)、大灰长角天牛 (*A. aedilis*)、小灰长角天牛 (*A. griseus*)、黑带长角天牛 (*A. stillatus*) 和台湾长角天牛 (*A. gundaiensis*)<sup>[2–3]</sup>。其中, 白带长角天牛被 2007 年公布的《进境植物检疫性有害生物名录》列为我国进境植物检疫性有害生物。

近年来, 随着我国进出口贸易的迅猛发展, 原木、板材及木质包装的进出口总量也与日俱增, 这些货物中极易携带大量天牛、小蠹等有害生物, 对我国口岸生物安全造成极大威胁。我国口岸曾多次在进境原木及木质包装中截获到长角天牛属昆虫。例如, 2013 年深圳口岸检疫人员从进境罗马尼亚云杉原木中截获了检疫性害虫——白带长角天牛<sup>[4]</sup>; 2016 年, 深圳蛇口口岸检疫人员在进境美国长叶松中首次截获到了结节长角天牛 (*A. nodosus*)<sup>[5]</sup>; 2016 年, 江苏常州口岸检疫人员在进境美国白松原木中首次截获到了斜带长角天牛 (*A. obliquus*)<sup>[6]</sup>。

面对如此严峻的生物入侵形势, 只有对有害生物进行快速、精确的鉴定才可以采取针对性的措施有效阻止其入侵我国。目前, 各口岸主要采用传统的昆虫种类鉴定方法, 即依据形态特征, 同时参照昆虫分类检索表的方法对长角天牛属天牛进行分类鉴定。但在口岸检疫过程中, 由于截获的天牛多以卵、幼虫、蛹或肢体残缺成虫的虫态出现, 利用形态学特征进行鉴定相当困难, 很多天牛标本就无法鉴定到种<sup>[7]</sup>。因此, 迫切须要探索新的鉴定技术来弥补传统鉴定方法的不足。截至目前, 利用分子生物学手段研究物种鉴定、系统发育已经成为昆虫学科的研究热点。其中, 由于线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因 (mtDNA *CO I*) 结构相对保守, 且种间差异比较大, 因此, 利用基于 *CO I* 基因序列片段的 DNA 条形码技术进行近缘种间鉴定及系统发育的研究已经得到了更为成熟的应用<sup>[8]</sup>。Stauffer 利用该 DNA 条形码技术对欧洲 7 种齿小蠹进行了快速准确的鉴定<sup>[9]</sup>。禹海鑫等应用该技术实现了白条天牛属 13 个种类准确高效的鉴定<sup>[10]</sup>。郭颖等也通过该技术实现了光肩星天牛幼虫种类的快速鉴定<sup>[11]</sup>。郑丝竹深入研究了天牛科基因条形码的构建方法及分子快速鉴定技术, 为探索天牛种类的分子鉴定方法提供了极有价值的参考<sup>[12]</sup>。

白带长角天牛作为重要的检疫性有害生物, 对其及所在属内多个种类天牛进行快速鉴定具有重要意义。本研究收集了 5 种口岸截获的长角天牛样本, 对其 *CO I* 片段进行扩增和测序, 并与 GenBank 中下载的 9 条 *CO I* 序列进行比对, 分析这些序列的碱基多样性、遗传距离和系统进化关系, 以期获得 1 种快速鉴定长角天牛种类的分子方法, 为今后农林部门及进出境植物检疫部门对长角天牛属昆虫的快速准确鉴定提供依据<sup>[13]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验样本

本试验所用标本由南通出入境检验检疫局有害生物检疫

收稿日期: 2017–08–01

基金项目: 江苏出入境检验检疫局科技计划 (编号: 2016KJ63)。

作者简介: 禹海鑫 (1984—), 男, 河南驻马店人, 博士, 农艺师, 主要从事植物检疫、昆虫分类和昆虫分子化学生态学方面的研究。Tel: (0513) 68588180; E-mail: haixin.007@163.com。

实验室提供,包括小灰长角天牛(*A. griseus*)、大灰长角天牛(*A. aedilis*)、斜带长角天牛、*A. princeps*、白带长角天牛 5 种长角天牛,所有天牛标本均由国内天牛专家安榆林研究员鉴定复核。标本来源与采集时间见表 1。另外,从 GenBank 网站获得小灰长角天牛、大灰长角天牛、*A. reticulatus*、*Acanthocinus* sp. CA14\_3.01 4 种长角天牛,及作为外群的棕榈象甲(*Rhynchophorus palmarum*)的共 9 条 *CO I* 序列(表 2),用于比对分析。其中,白带长角天牛是我国进境植物检疫性昆虫,其他长角天牛均是其同属近似种。

表 1 供试标本的来源及采集时间

种名	来源地	采集时间 (年-月)
小灰长角天牛 1	俄罗斯	2015-08
小灰长角天牛 2	中国	2015-08
大灰长角天牛 1	意大利	2013-07
斜带长角天牛 1	美国	2012-07
斜带长角天牛 2	美国	2012-07
<i>A. princeps</i> 1	美国	2012-07
白带长角天牛	俄罗斯	2007-07

表 2 本研究使用的 GenBank 下载的 *CO I* 基因序列信息

种名	GenBank 登录号
小灰长角天牛 2	KM450656.1
小灰长角天牛 3	KM450534.1
小灰长角天牛 5	KJ966915.1
大灰长角天牛 2	HM909066.1
大灰长角天牛 3	HQ559242.1
大灰长角天牛 4	KC593303.1
<i>A. reticulatus</i>	KM285803.1
<i>Acanthocinus</i> sp. CA14_3.01	KY357619.1
棕榈象甲	AY131121.1

## 1.2 样品组织基因组 DNA 提取

用 GenMagBio 动物细胞组织/细胞基因组 DNA 磁珠提取试剂盒(北京金麦格生物技术有限公司)提取上述各个样品的基因组 DNA。提取步骤如下:剪取适当大小的经乙醇浸泡的各天牛样品肌肉组织(应少于 30 mg),用双蒸水冲洗干净后,装入 1.5 mL 离心管中并置于 MM400 球磨仪(德国 retsch 公司提供)中振荡研磨 60 s(30 次/s),再将磨碎的组织离心 10 min(转速为 12 000 r/min)。离心后加入 180  $\mu$ L 裂解缓冲液及 20  $\mu$ L 蛋白酶 K,漩涡振荡,重悬已经预处理的组织样品,然后放入 55  $^{\circ}$ C 水浴锅中温浴 1~3 h,直至组织样品完全裂解消失。加 200  $\mu$ L 无水乙醇、200  $\mu$ L Binding Buffer、20  $\mu$ L 磁珠,磁珠用于吸附组织中的基因组 DNA。加入 500  $\mu$ L Wash Buffer 去除杂质后,再加入 20  $\mu$ L Elution Buffer,静置 10 min 后洗脱磁珠,便可获得样品组织的基因组 DNA 溶液<sup>[14-15]</sup>。

## 1.3 *CO I* 片段扩增与测序

本试验 PCR 扩增反应采用巢氏 PCR,在 ProFlex<sup>TM</sup> PCR 仪(美国 ABI 公司提供)上进行。反应采用 25  $\mu$ L 体系,包括 1.0  $\mu$ L 基因组 DNA 模板、2.0  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (25.0 mmol/L)、2.5  $\mu$ L 10 $\times$ buffer(不含 Mg<sup>2+</sup>)、1.0  $\mu$ L dNTPs (2.5 mmol/L)、0.4  $\mu$ L rTaq DNA 聚合酶(5.0 U/ $\mu$ L,购自 TaKaRa 公司),各

0.5  $\mu$ L 上、下游引物(10.0  $\mu$ mol/L,由南京金斯瑞生物科技有限公司合成),再加灭菌水补至总体积为 25  $\mu$ L。PCR 扩增反应条件如下:94  $^{\circ}$ C 5 min;94  $^{\circ}$ C 40 s,55  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 1 min,36 个循环;72  $^{\circ}$ C 10 min。反应结束后将产物送至南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序分析<sup>[10,12]</sup>。巢式 PCR 第 1 轮反应引物为 F-1、R-1,第 2 轮 PCR 引物为 F-2、R-2<sup>[12]</sup>,各引物序列信息如表 3 所示。本研究采用巢式 PCR,既降低了扩增出非目的基因条带的概率,又增强了该 PCR 检测的可信度和灵敏度<sup>[12]</sup>。

表 3 巢式 PCR 所用引物序列

引物名称	引物序列 (5'→3')
F-1	TAACACCACATGCTTTAGTA
R-1	GGATTGTCTGAGTATCGTGG
F-2	GGAGCATTTCGAATTTGATTACTT
R-2	CCCCGTAATAATTATAAACTTC

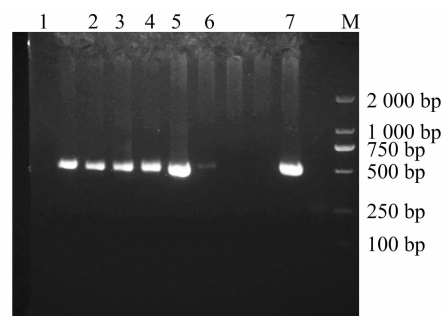
## 1.4 序列处理及分析

将各样品 *CO I* 序列测序结果导入 DNASTar 中的 SeqMan 分析软件中进行拼接与手工校正<sup>[16]</sup>。利用美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,简称 NCBI)的 Blast 工具进行序列相似性搜索,以确定序列的方向和可信度。再将所测序列以及从 GenBank 下载的 8 条长角天牛序列一同载入 Clustal X 1.83 软件进行比对,输出格式为 FASTA<sup>[17]</sup>。最后将所有比对结果导入 MEGA 5.20 软件中<sup>[18]</sup>计算各种类间的遗传距离、转换和颠换值及其比值(R)、变异位点(variable sites,简称 V)及保守位点(conserved sites,简称 C)等数值<sup>[13]</sup>,同时,利用邻接法(neighbor-joining,简称 NJ),选取 Kimura 2-parameter 遗传距离模型,建立系统发育树。

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA 凝胶电泳结果

本试验对 5 种长角天牛共 7 个样品的基因组 DNA 进行 *CO I* 基因片段巢式 PCR 扩增,由图 1 的电泳结果可以看出,7 个样本在 525 bp 处均有清晰且特异性良好的目的条带,可满足后续基因测序的需要。



1—小灰长角天牛 1; 2—小灰长角天牛 2; 3—大灰长角天牛 1;  
4—斜带长角天牛 1; 5—斜带长角天牛 2; 6—*A. princeps*;  
7—白带长角天牛; M—DL2000 marker

图 1 长角天牛属昆虫样本 *CO I* 序列扩增的电泳结果

### 2.2 长角天牛 *CO I* 序列解析

2.2.1 *CO I* 基因序列组成和变异特征 将测序和下载的各条序列导入 MEGA 5.20 软件中,剪切成同等长度片段

(434 bp)<sup>[19]</sup>。结果发现,保守位点(C)、变异位点(V)、自裔位点(S)和简约信息(Pi)位点分别有 199、235、56、179 个。另外,统计所有位点的碱基平均含量发现,A 平均含量为 29.8%,T 为 34.1%,G 为 14.4%,C 为 21.7%<sup>[12]</sup>。其中,A、T 的含量相近,且 A+T 含量高达 63.9%,明显高于 G+C 含量(36.1%),表现出明显的 A+T 碱基偏嗜,这也基本符合昆虫线粒体基因碱基组成的基本规律<sup>[19-20]</sup>。

2.2.2 碱基替换规律分析 用 MEGA 5.20 软件分析序列

各位点碱基替换规律<sup>[21]</sup>。由表 4 可以看出,整体位点的转换主要出现在 C 与 T 之间,颠换则主要出现在 T 与 A 之间,转换/颠换比值(R 值)为 0.83。对密码子各位点分析发现,转换和颠换主要在密码子第 2 位点上发生,且转换与颠换值相当(R=0.74)。此外,第 1、3 位点 R 值分别为 0.59、1.29。无论整体或是密码子各位点,R 值均小于 2,表明该序列转换与颠换未达到饱和,在构建系统发育树时要考虑转换与颠换的发生概率。

表 4 核甘酸碱基替换结果

类别	ii	si	sv	R	TT	TC	TA	TG	CT	CC	CA	CG	AT	AC	AA	AG	GT	GC	GA	GG	总计
Avg	344.00	41.00	49.00	0.83	117.00	19.00	14.00	2.00	12.00	69.00	5.00	2.00	12.00	9.00	104.00	6.00	2.00	3.00	4.00	53.00	433.75
1st	135.00	4.00	6.00	0.59	56.00	1.00	1.00	0.00	1.00	39.00	0.00	1.00	2.00	0.00	21.00	1.00	0.00	2.00	1.00	19.00	145.00
2nd	86.00	25.00	34.00	0.74	32.00	13.00	11.00	1.00	7.00	9.00	4.00	0.00	9.00	7.00	45.00	3.00	1.00	1.00	2.00	1.00	144.75
3rd	122.00	12.00	9.00	1.29	29.00	5.00	2.00	1.00	3.00	22.00	1.00	0.00	2.00	2.00	39.00	2.00	2.00	0.00	2.00	33.00	144.00

注:Avg 表示平均频率,1st 表示第 1 位点,2nd 表示第 2 位点,3rd 表示第 3 位点,ii 表示相同碱基对,si 表示转换碱基对,sv 表示颠换碱基对,R 表示转换碱基对/颠换基对。

2.2.3 遗传距离分析 根据 Kimure 2-parameter 模型分析 7 种 15 头长角天牛和 1 个外种群之间的遗传距离,将转换和颠换考虑在内,利用 Bootstrap 值(1 000 次)进行检验<sup>[21]</sup>。由表 5 可以看出,长角天牛属内相同物种内的遗传距离数值介于 0.000~0.016 内,平均遗传距离为 0.01,其中小灰长角天牛种内距离最小,为 0~0.014;斜带长角天牛种内距离最大,为 0.016;长角天牛属不同种间的遗传距离介于 0.055~0.

629 之间,平均遗传距离为 0.350,其中相似种 *A. princeps* 与白带长角天牛之间的遗传距离最小,为 0.055;斜带长角天牛 1 与 *A. reticulatus* 之间的遗传距离最大,为 0.629。可见,同一物种内的遗传距离较近,基本不受其地理分布的影响;同属不同种类间的遗传距离较远,呈现出较为明显的遗传差异性,可考虑将此段序列作为鉴别不同物种的依据。

表 5 基于 Kimure 2-parameter 模型长角天牛属的种内、种间遗传距离

物种序号	遗传距离														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
2	0.000														
3	0.135	0.135													
4	0.606	0.606	0.598												
5	0.604	0.604	0.599	0.016											
6	0.553	0.553	0.532	0.119	0.098										
7	0.543	0.543	0.574	0.113	0.100	0.055									
8	0.013	0.013	0.232	0.623	0.615	0.581	0.552								
9	0.009	0.009	0.136	0.601	0.599	0.549	0.543	0.014							
10	0.005	0.005	0.138	0.606	0.604	0.547	0.537	0.013	0.014						
11	0.139	0.139	0.012	0.610	0.611	0.542	0.586	0.240	0.139	0.142					
12	0.127	0.127	0.012	0.593	0.595	0.527	0.576	0.228	0.133	0.130	0.019				
13	0.127	0.127	0.012	0.593	0.595	0.527	0.576	0.228	0.133	0.130	0.019	0.000			
14	0.134	0.134	0.106	0.629	0.623	0.576	0.595	0.220	0.134	0.137	0.116	0.112	0.112		
15	0.014	0.014	0.145	0.580	0.566	0.511	0.519	0.176	0.028	0.014	0.148	0.142	0.142	0.137	
16	0.662	0.662	0.581	0.752	0.724	0.766	0.762	0.641	0.657	0.662	0.603	0.600	0.600	0.598	0.665

注:1 表示小灰长角天牛 1;2 表示小灰长角天牛 2;3 表示大灰长角天牛 1;4 表示斜带长角天牛 1;5 表示斜带长角天牛 2;6 表示 *A. princeps*;7 表示白带长角天牛;8 表示小灰长角天牛 5;9 表示小灰长角天牛 3;10 表示小灰长角天牛 4;11 表示大灰长角天牛 2;12 表示大灰长角天牛 3;13 表示大灰长角天牛 4;14 表示 *A. reticulatus*;15 表示 *Acanthocinus* sp. CA14\_3.01;16 表示棕榈象甲。

2.2.4 系统发育树的建立 采用 MEGA 5.20 分析软件,选择棕榈象甲为外群,以长角天牛属 7 种昆虫共 15 条 *CO I* 序列为靶标,使用邻接法建立系统发育树。从图 2 可以看出,从整体上看,长角天牛属各近似种聚为一大支,而外群棕榈象甲单独成 1 支,此聚类结果与形态学鉴定结果一致。在长角天牛属所聚的一大支中,7 种长角天牛又分聚为 2 支,其中小灰长角天牛、大灰长角天牛、*A. reticulatus* 和 *Acanthocinus* sp.

CA14\_3.01 聚为 1 支,说明这 4 种长角天牛的遗传进化关系较为接近,互为近缘种;同时,又与聚为另 1 支的斜带长角天牛、*A. princeps* 及白带长角天牛遗传进化关系较远,也说明彼此之间的亲缘关系较远,2 支互为姊妹群。从局部来看,同一种类不同个体之间各聚为一小支,且置信度很高,这样就很容易和其他种类的长角天牛区分开来。上述结果表明,长角天牛属不同种类之间的系统进化差异明显,因此可将此 DNA 条

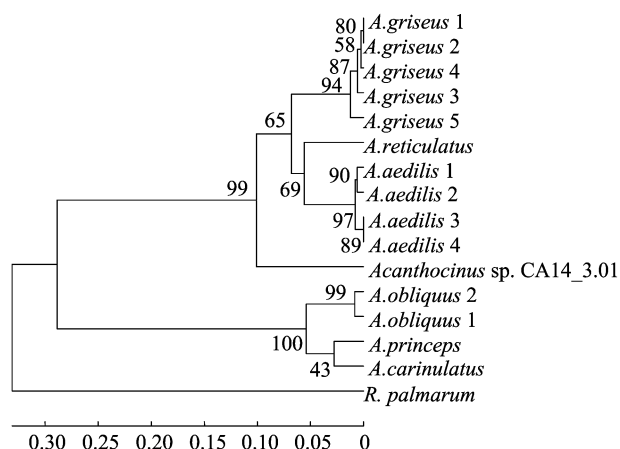


图2 邻接法构建长角天牛属部分种类系统发育树

形码用作长角天牛属不同种类分子鉴定的依据。

### 3 结论与讨论

一般而言,使用 DNA 条形码对物种进行快速准确的鉴定须要满足 2 个必要条件:首先每个物种都要具有独特且又相对保守的 DNA 条形码序列;其次是该条形码序列种间差异必须远大于其种内的差异<sup>[8]</sup>。本研究所采用的线粒体 *CO I* 基因序列就满足上述条件。首先,地球上几乎所有真核生物都含有线粒体 *CO I* 基因,且该基因含有很多相对保守的遗传信息位点。其次,对 7 种 15 头长角天牛基于线粒体 *CO I* 基因的种内及种间遗传距离进行计算,发现种内遗传距离为 0.000 ~ 0.016,平均为 0.01;种间遗传距离介于 0.055 ~ 0.629 之间,平均为 0.35;种间遗传距离是种内遗传距离的 35 倍,完全符合种间差异应大于种内差异 10 倍以上的物种鉴定原则。事实上,线粒体 *CO I* 基因常被作为 DNA 条形码,用于昆虫种类鉴定及系统发育学的研究,类似的基因还有 *Cytb*、*18S*、*28S*、*5.8S*、*ITS*、*rbcl*、*matK* 等<sup>[22]</sup>。王颖等利用 *CO I* 基因作为 DNA 条形码,实现了对山东口岸进境原木截获蚊虫种类的快速鉴定<sup>[23]</sup>。董昆应用 *CO I* 基因分析了苹果蠹蛾不同地理种群间的遗传差异,并实现了对其幼虫的快速鉴定<sup>[24]</sup>。赵文静等利用 *CO I* 及 *ITS* 序列作 DNA 条形码深入研究了环带库蚊的分类地位和杂鳞库蚊重组内各亲缘种的系统发育关系<sup>[25]</sup>。

目前我国口岸昆虫种类鉴定主要依赖于完整成虫的形态特征,而实际上口岸截获到的多是昆虫的卵、幼虫、蛹及肢体残破的成虫。卵、幼虫和蛹须要花费较长时间培养至成虫阶段才能进行种类鉴定,而肢体残破的成虫则失去了形态学鉴定的价值。用 DNA 条形码技术就能很容易突破上述形态学鉴定方法遇到的瓶颈<sup>[26]</sup>。但是目前该技术<sup>[27]</sup>在长角天牛属种类鉴定中的应用还鲜有报道。本研究通过对 5 种长角天牛 *CO I* 基因所测序列与 GenBank 部分长角天牛 *CO I* 序列进行比对分析,发现该段序列既能高效区分部分长角天牛种类,又能提供丰富的物种亲缘关系信息。此外,本研究还首次对斜带长角天牛、白带长角天牛和 *A. princeps* 的 *CO I* 基因序列进行测序,不仅补充了长角天牛属 *CO I* 基因数据库,还将为基于 *CO I* 基因快速鉴定其他种类天牛的研究提供有益参考。值得注意的是,由于本研究未收集到全部的长角天牛属

种类,仅能针对部分种类进行分析,因此本研究采用的 DNA 条形码尚不能确定可以完全鉴别所有的长角天牛种类,只能说明 DNA 条形码技术<sup>[27]</sup>在长角天牛属昆虫分子鉴定上具有可行性。后续研究应围绕收集长角天牛属其他种类,完善 *CO I* 基因数据库,结合多个基因共同分析等方向努力,以期获得更高效的 DNA 条形码,进而得到更精确的系统发育进化树。

### 参考文献:

- [1] 安翰林. 外来森林有害生物检疫[M]. 北京:科学出版社,2012: 197-198.
- [2] 陈乃中. 中国进境植物检疫性有害生物——昆虫卷[M]. 北京:中国农业出版社,2009:186-194.
- [3] 殷玉生,赵宇,杨晓军,等. 白带长角天牛检疫鉴定方法:SN/T 3271—2012[S].
- [4] 向才玉. 动植中心深圳口岸首次从罗马尼亚原木中截获白带长角天牛[EB/OL]. [2017-07-02]. <http://dzzx.szciq.gov.cn/detail.aspx?cid=516>.
- [5] 汪莹,陈志萍,向才玉,等. 深圳局全国首次截获结节长角天牛[J]. 植物检疫,2016,30(6):79.
- [6] 钱路,张宏伟,李健,等. 常州局首次截获斜带长角天牛[J]. 植物检疫,2017,31(1):47.
- [7] 刘勇,宋毓,李晓宇. 基于线粒体 *CO I* 基因的 DNA 条形码技术在昆虫分子鉴定中的应用[J]. 植物检疫,2010,24(2):46-50.
- [8] Hebert P N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proceedings of the Royal Society of London Biological Sciences,2003,270(1512):313-321.
- [9] Stauffer C. A molecular method for differentiating sibling species within the genus *Ips*[R]. USDA Forest Service General Technical Report,1997:87-91.
- [10] 禹海鑫,徐梅,徐宁,等. 白条天牛 DNA 条形码鉴定技术[J]. 福建林业科技,2016,43(2):90-94,116.
- [11] 郭颖,王德朋,和东旭,等. 基于 *CO I* 序列的光肩星天牛快速分子鉴定[J]. 植物检疫,2014,28(4):46-49.
- [12] 郑斯竹. 天牛科基因条形码构建及分子快速鉴定技术研究[D]. 南京:南京林业大学,2012:35-84.
- [13] 常虹,郝德君,肖荣堂,等. 基于线粒体 *CO I* 基因的齿小蠹属昆虫 DNA 条形码研究[J]. 昆虫学报,2012,55(9):1075-1081.
- [14] 花婧,郑斯竹,安翰林,等. 基于线粒体 *COI* 基因的大小蠹属昆虫 DNA 条形码研究[J]. 江苏农业科学,2014,42(3):30-32.
- [15] 常虹. 口岸截获小蠹科昆虫 DNA 条形码技术研究[D]. 南京:南京林业大学,2013:10-26.
- [16] Parchman T L, Geist K S, Grahnen J A, et al. Transcriptome sequencing in an ecologically important tree species: assembly, annotation, and marker discovery[J]. BMC Genomics, 2010, 11:180.
- [17] Chenna R, Sugawara H, Koike T, et al. Multiple sequence alignment with the clustal series of programs[J]. Nucleic Acids Research, 2003,31(13):3497-3500.
- [18] Kumar S, Nei M, Dudley J, et al. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences[J]. Briefings in Bioinformatics,2008,9(4):299-306.

杨 婷,李仟仟,史红安,等. 3 种酚类物质对油茶炭疽病病菌的抑菌机制[J]. 江苏农业科学,2018,46(23):106-109.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.23.026

### 3 种酚类物质对油茶炭疽病病菌的抑菌机制

杨 婷<sup>1,2</sup>, 李仟仟<sup>1</sup>, 史红安<sup>1</sup>, 吴梅凤<sup>1</sup>, 张志林, 王立华<sup>1</sup>

(1. 湖北工程学院特色果蔬质量安全控制湖北省重点实验室/湖北工程学院生命科学技术学院,湖北孝感 432000;

2. 湖北大学生命科学学院,湖北武汉 430062)

**摘要:**为明确酚类物质对油茶炭疽病的多重作用方式及活性机制,从香芹酚、丁香酚、异丁香酚对油茶炭疽菌菌丝的细胞膜通透性、可溶性蛋白和还原糖含量的影响进行研究。结果表明:处理后,油茶炭疽菌菌丝畸变,粗细不均,分支增多,局部膨大;油茶炭疽菌菌丝处理液的电导率随处理时间和酚类化合物浓度增加而增大;香芹酚、丁香酚、异丁香酚在浓度为 400  $\mu\text{g/mL}$  时,处理 12 h 后病原菌菌丝体内的可溶性蛋白含量分别为 7.55、7.69、8.01  $\text{mg/g}$ ,还原糖含量分别为 4.95、6.18、5.71  $\text{mg/g}$ 。试验结果为将香芹酚、丁香酚、异丁香酚开发成天然杀菌剂应用于农业生产实践提供了理论依据。

**关键词:**酚类物质;油茶炭疽病;抑菌机理;通透性;可溶性蛋白;还原糖

**中图分类号:** S763.744 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)23-0106-04

油茶(*Camellia oleifera* Abel)属山茶科(Theaceae)山茶属(*Camellial*)植物,为我国特有的优质食用油料植物<sup>[1]</sup>。茶油易被人体吸收,且烟点高,不含对人体有害的黄曲霉毒素、棉酚、芥酸等成分<sup>[2-3]</sup>。此外,茶油还具有保健功能,能提高人体免疫力,减轻脂肪堆积,降低血浆中胆固醇浓度,有效改善和预防高血压、冠心病、动脉硬化等心血管疾病<sup>[4-6]</sup>,是一种高档的保健食用油。茶油被联合国粮食及农业组织作为重点推广对象<sup>[7]</sup>。但是随油茶种植面积的增加,油茶病害日趋严重,生产绿色无公害茶油,已成为我国油茶产业可持续发展急需解决的关键问题<sup>[8]</sup>。

油茶炭疽病病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)是油茶的主要病害之一,严重影响油茶的生长和产量<sup>[9]</sup>。萜类化合物为植物代谢的主要产物,具有抑菌活性强、低毒、易降解、不污

染环境、不易产生抗性等优点,是一种安全高效的天然杀菌剂<sup>[10-11]</sup>。前期研究发现,萜类化合物中香芹酚、丁香酚、异丁香酚对油茶炭疽病病菌具有较好的抑制活性。本试验研究香芹酚、丁香酚、异丁香酚对油茶炭疽病病菌细胞膜通透性、可溶性蛋白和还原糖含量的影响,了解其作用机制,以期将为香芹酚、丁香酚、异丁香酚开发成天然杀菌剂提供理论依据。

#### 1 材料与方法

##### 1.1 供试萜类化合物

香芹酚(carvacrol)、丁香酚(eugenol)、异丁香酚(isoeugenol)购自梯希爱(上海)化成工业发展有限公司,纯度大于 95%。

##### 1.2 供试病原菌

油茶炭疽病病菌从湖北省孝感市区植物病株上采得,采用常规组织分离法分离纯化病原菌,并观察其形态学特征,同时结合 rDNA-ITS(内转录间隔区)序列分析,对病原菌进行分离和分子鉴定得到<sup>[12]</sup>。

##### 1.3 试验方法

1.3.1 萜类化合物对病原菌菌丝形态的影响 在无菌条件下,用 6 mm 打孔器在培养好的供试菌菌落边缘打取长势相同的菌饼接入萜类化合物系列浓度梯度为 50、100、200、

收稿日期:2017-07-18

基金项目:湖北省教育厅科研项目(编号:B2016185);湖北省自然科学基金(编号:2014CFB571);特色果蔬质量安全控制湖北省重点实验室开放课题。

作者简介:杨 婷(1990—),女,湖北孝感人,硕士研究生,研究方向为植物病虫害。E-mail:xyangting@163.com。

通信作者:张志林,博士,研究方向为化学生态学。E-mail:zhangzhilin913@sina.com。

[19]郑斯竹,张 凯,杨晓军,等. 墨天牛属昆虫 *CO I* 基因比较及系统学初步研究[J]. 应用昆虫学报,2015,52(2):370-381.

[20]Liu H,Beckenbach A T. Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene among 10 orders of insects [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution,1992,1(1):41-52.

[21]Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution,2011,28(10):2731-2739.

[22]张裕君,刘跃庭,廖 芳,等. DNA 条形码技术研究进展及其在植物检疫中的应用展望[J]. 中国植保导刊,2010,30(4):15-17.

[23]王 颖,王 勇,高 涛,等. DNA 条形码技术用于原木携带蚊种的鉴定[J]. 中国国境卫生检疫杂志,2013(4):249-251.

[24]董 昆. 基于 *CO I* 基因的苹果蠹蛾地理种群遗传差异分析及幼虫快速分子鉴定[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2010.

[25]赵文静,张春林,陈汉彬,等. 基于 *CO I* 与 *ITS* 序列的杂鳞库蚊复组(双翅目:蚊科)分子系统发育[J]. 环境昆虫学报,2016(4):821-830.

[26]彭居刚,王绪桢,何舜平. DNA 条形码技术的研究进展及其应用[J]. 水生生物学报,2008,32(6):916-919.

[27]袁俊杰,马新华,龙 阳,等. 利用 DNA 条形码对 10 种苍耳属杂草的鉴定[J]. 杂草学报,2016,34(3):11-16.