

外来入侵昆虫长林小蠹快速鉴定方法

李承锦 姚艳霞*

(中国林业科学研究院森林生态环境与自然保护研究所/国家林业和草原局森林保护学重点实验室 北京 100091)

摘要: 【目的】长林小蠹 *Hylurgus ligniperda* 是我国新发生的重要外来入侵种, 在我国胶东半岛对日本黑松造成严重危害。由于长林小蠹具有危害重、防治难、扩散能力强等特点, 对我国松树资源构成了严重威胁, 因此, 应及时开展检验检疫工作、加强早期监测与预警, 遏制其在我国进一步扩散。然而, 长林小蠹各虫态体型较小, 特别是在幼期(卵、幼虫、蛹), 较难通过外部形态进行准确识别, 迫切需要研发适用于各发育阶段的快速鉴定技术。【方法】基于种特异性引物 PCR 扩增(SS-PCR)与重组酶聚合酶扩增和侧流层析试纸条(RPA-LFD)技术, 建立了两种长林小蠹快速鉴定方法。【结果】在掌握长林小蠹线粒体基因组结构与组成的基础上, 通过分析长林小蠹及其他 43 种小蠹线粒体基因组的 13 个蛋白编码基因, 分别构建了最大似然树和贝叶斯树, 筛选了与长林小蠹亲缘关系最近的 3 种小蠹作为后续研发快速鉴定方法的非靶标物种; 通过对 13 个蛋白编码基因进化速率分析, 选择了线粒体基因 COI、ND2、ND4、ND5 为 SS-PCR 的靶标, 分别设计了一对长林小蠹种特异性引物, 建立了长林小蠹 SS-PCR 快速鉴定方法, 其特异性和灵敏度良好, 并可在 2 - 3 小时内完成; 以长林小蠹的线粒体基因 ND2 为靶标, 针对 ND2 基因的保守区域设计了 1 对 RPA 引物 (HLRPAF/HLRPAR) 和 3 条探针 (P1、P2 和 P3), 经验证, 其中 P3 探针性能稳定, 灵敏度较高, 能够准确识别不同地理种群和不同虫态的长林小蠹, 适用于外来入侵昆虫精准快速鉴定, 高灵敏度使该鉴定方法可 DNA 粗提取方法相结合来, 能够在野外现场对长林小蠹各虫态进行准确鉴定, 整个检测过程用时不足 35 分钟。【结论】本研究建立的两种长林小蠹快速鉴定方法均具有耗时短、操作简便、高特异性、高灵敏度的特点, 可实现对长林小蠹各虫态快速、精准、高效地鉴定, 能够满足实际需要, 为外来入侵昆虫的精准快速鉴定提供了技术保障。

关键词: 外来入侵害虫; 长林小蠹; 快速鉴定