

我国烟蚜种群分化的 RAPD 分析*

杨效文 张孝義

(南京农业大学植物保护系, 南京 210095)

陈晓峰 王瑛

(中国科学院动物研究所, 北京 100080)

摘要 用 RAPD-PCR 技术研究了我国烟草上烟蚜 *Myzus persicae* (Sulzer) 的种群分化。结果表明: 我国烟蚜的不同地理种群和不同体色之间 DNA 均呈现出多态性, 且不同的引物可在不同水平上反应出烟蚜种群的 DNA 多态性。Nei 的遗传距离表明我国烟草上烟蚜的分化仅在种群水平上, 并未达到亚种水平。用相似性指数和 Nei 的遗传距离对所筛选的三个引物 OPX-04、OPX-06 和 OPX-19 的扩增结果进行聚类, 虽然二者的结果不一致, 但均可反应出烟蚜的地理种群和体色生物型的 DNA 差异。在 DNA 水平上, 与完全周期生活史的烟蚜相比, 完全周期和不完全周期生活史混合发生的烟蚜与不完全周期生活史的烟蚜更为接近, 而两种生活史混合发生的烟蚜之间无明显差异。从体色看, 红色比黄绿色更接近褐色。

关键词 烟蚜, RAPD-PCR, 相似性指数, 遗传距离, 种群分化

烟蚜 *Myzus persicae* (Sulzer) 是一种重要的农业害虫, 该虫不仅直接为害寄主植物, 而且可传播 115 种植物病毒(占整个蚜虫传播的 170 种植物病毒的 67.7%), 其损失往往更为严重。许多学者根据烟蚜的体色变化, 将其划分为许多型, 如田中正(1975)将烟蚜分为绿色型和红色型。Rijagopa^[1]将其划分为黄色型、绿色型和红色型。王茂涛等^[2]将烟蚜分为红色型、黄绿色型和褐色型, 并认为这三种生物型比较稳定, 可能是由遗传基因控制的, 各体色生物型不仅在体色上有差别, 而且在形态上也有一定区别, 三种生物型对温度的适应性也不同。杨效文等^[3]研究表明, 红色和绿色烟蚜在白菜和烟草上的种群增长特性有所不同。Lampert 和 Dennis^[4]报道红色比绿色有更高的生殖率。Harlow 和 Lampert^[5]报道红色比绿色对杀虫剂的抗性更高。George Tamaki 等^[6]报道, 在 5℃ 和 10℃ 条件下, 不全周期的绿色胎生蚜比全周期的黄色烟蚜有较低的死亡率和较高的繁殖率, 但若虫的发育速率基本相同。Blackman^[7]报道烟蚜染色体的易位与对有机磷农药的抗性有关, 且红色型全部为易位个体, 而绿色型中既有易位个体, 也有正常个体。烟蚜在我国其生活史较复杂, 北方为全周期型, 南方为不全周期型, 而在中部地区两种生活史并存。目前关于烟蚜不同生活史和不同体色之间差异的遗传背景研究不多, 而 RAPD-PCR 技术已运用于昆虫研究的许多方面^[8~11], 本研究用 RAPD-PCR 技术来分析我国烟蚜的地理种群和体色之间的 DNA 多态性, 旨为该虫的种群分

* 国家自然科学基金资助项目(39670493)

1997-10-20 收稿, 1998-10-14 收修改稿

化研究、虫情监测以及系统治理提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试烟蚜

本研究所用烟蚜均为孤雌胎生无翅成虫，采自烟田，详情见表 1。样品采集后速冻于 -40℃ 保存。

表 1 本研究中所用烟蚜样品

Table 1 List of samples of *Myzus persicae* included in the study

编号 Ref. No.	采集地点 Collection locality	纬度 (°N) Latitude	烟草品种 Variety	体色 Color
A	河南宜阳 Yiyang	34.5	NC89	红 Red
B	河南宜阳 Yiyang	34.5	NC89	黄绿 Yellowish-green
C	河南宜阳 Yiyang	34.5	NC89	褐 Brown
D	吉林长春 Changchun	43.9	NC89	红 Red
E	吉林长春 Changchun	43.9	NC89	黄绿 Yellowish-green
F	吉林长春 Changchun	43.9	NC89	褐 Brown
G	江苏南京 Nanjing	32.0	NC89	红 Red
H	江苏南京 Nanjing	32.0	NC89	黄绿 Yellowish-green
I	江苏南京 Nanjing	32.0	NC89	褐 Brown
J	湖南郴州 Chengzhou	25.8	K326	褐 Brown
K	湖南郴州 Chengzhou	25.8	G80	黄绿 Yellowish-green

1.2 基因组 DNA 提取

将单个蚜虫在 200 μL 提取缓冲液中 (1% SDS, 50 mmol/L Tris-Cl, pH8.0, 25 mmol/L NaCl, 25 mmol/L EDTA) 用牙签捣碎, 65℃ 水浴 45 min 后, 加入 3 mol/L 100 μL 醋酸钾, 冰上放置 1 h, 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 加入 2 倍体积的冰冷无水乙醇, 混匀, -20℃ 放置 1 h 以上, 12 000 r/min 离心 20 min, 用 70% 乙醇洗一次, 在 37℃ 干燥后, 加入 20 μL pH 8.0 TE (10 mmol/L Tris-HCl, pH7.4, 1 mmol/L EDTA, pH8.0) 放入 55℃ 水浴 8 h 以上, 4℃ 保存待用。

1.3 引物

本研究所用引物见表 2, 均由 OPERON 公司提供。

1.4 DNA 扩增

将模板 DNA 提取液在扩增前稀释 5 倍。扩增反应液含引物 20 ng, 0.1 mmol/L dNTP, 0.5 单位 Taq 酶, 10×缓冲液, 2 mmol/L MgCl₂, 3 μL 模板 DNA, 用双蒸水加至 25 μL, 再加 25 μL 石蜡油。扩增在 PE480 DNA 扩增仪上进行, 条件为 94℃ 5 min, 后进行 45 个循环, 即

94℃ 1 min, 36℃ 1 min, 72℃ 2 min, 最后在 72℃ 延伸 10 min, 保存于 4℃。每个样品扩增 8 头蚜虫（均属不同的克隆）。

表 2 RAPD 所用引物

Table 2 Nucleotide sequences of random primers

引物号 Primer	5'-3'序列 5'-3'Sequence	引物号 Primer	5'-3'序列 5'-3'Sequence
OPD-02	GCACCCAACC	OPX-01	CTGGGCACGA
OPD-11	AGCCGCCATTG	OPX-04	CCGCTACCGA
OPD-13	GGGGTGACGA	OPX-06	ACGCCAGAGG
OPD-15	CATCCGTGCT	OPX-10	CCCTAGACTG
OPC-13	AAGCCTCGTC	OPX-11	GGAGCCTCAG
OPC-16	CACACTCCAG	OPX-12	TCGCCAGCCA
OPC-18	TGAGTGGGTG	OPX-14	ACAGGTGCTG
OPC-19	GTTGCCAGCC	OPX-19	TGGCAAGGCA
OPC-20	ACTTCGCCAC	OPX-20	CCCAGCTAGA
OPC-08	TGGACCGGTG		

1.5 结果计算

将扩增后的 DNA 在 1.2% 琼脂糖胶上电泳，电压 50 V，电泳 3.5 h，电泳缓冲溶液为 1×TBE。读带后分别计算： $SI = 2 N_{AB} / (N_A + N_B)$ ， SI ：相似性指数， N_A ：A 个体的带数， N_B ：B 个体的带数， N_{AB} ：A 和 B 两个个体的共享带数。

用 $1 - SI$ 为距离矩阵进行分析。 $D = \ln I$, $I = I_{ab} / \sqrt{(I_a \cdot I_b)}$ ，其中， $I_{ab} = \sum a_i b_i / n$, $I_a = \sum a_i^2 / n$, $I_b = \sum b_i^2 / n$, D ：遗传距离， n 为所研究的基因座个数， a_i , b_i 分别为第 i 个基因在群体 A 和 B 中出现的频率。

将每个样品的 8 个个体进行平均后，用 SAS (6.04) 进行聚类分析。

2 结果

2.1 不同引物对烟蚜 DNA 的扩增结果

本研究所用的 DNA 提取方法获得的单头蚜虫的 DNA 至少可进行 30 次扩增反应，同时步骤简单，污染少，DNA 机械损伤减少，且可保存较长时间（4℃ 下可保存 3 个月，-20℃ 下可保存 6 个月以上）。

本研究所用的 19 个引物中，有 4 个未出带，带最多的为 11 条，多数引物的带数为 5~9 条。其中 OPX-04、OPX-06 和 OPX-19 三个引物的带数较多，且具有代表性，本文则以它们为主进行分析。

同一个个体同一种引物的扩增重复性较好，说明本研究中所用方法可行。同一引物不同个体间差异较大（图 1 和图 2）。从图 1 和图 2 可以看出，同为引物 OPX-04，但不同烟蚜个体

间在总带数以及带出现的位置上有所不同。如图 2 中，个体 I、J、K 在 2.0 kb 的位置上有明显的强带，而图 1 中的个体 I、J、K 在 2.0 kb 的位置上则无带或为弱带。即反应出烟蚜种群内不同基因型的频率变化。

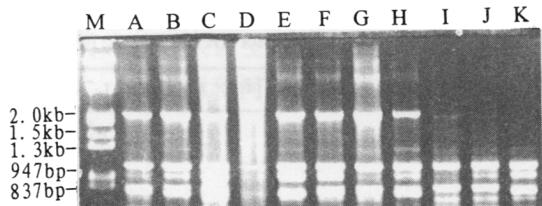


图 1 引物 OPX-04 对单头烟蚜的
RAPD-PCR 扩增结果 I

Fig. 1 RAPD amplifications with primer
OPX-04 to single aphid I

(marker: *Eco*RI-*Hind*III digest Lambda DNA, same below)

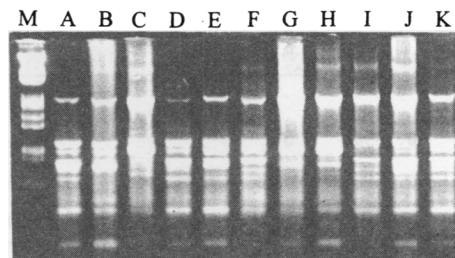


图 2 引物 OPX-04 对单头烟蚜的
RAPD-PCR 扩增结果 II

Fig. 2 RAPD amplifications with primer
OPX-04 to single aphid II

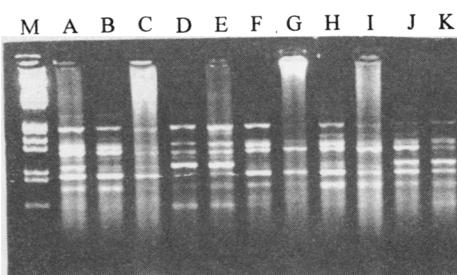


图 3 引物 OPX-06 对单头烟蚜的
RAPD-PCR 扩增结果

Fig. 3 RAPD amplifications with primer
OPX-06 to single aphid

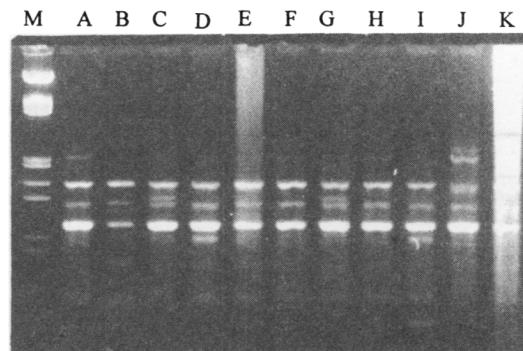


图 4 引物 OPX-19 对单头烟蚜的
RAPD-PCR 扩增结果

Fig. 4 RAPD amplifications with primer
OPX-19 to single aphid

图 1、图 3 和图 4 示同一个体用不同引物的扩增结果。从中可以看出，同一个体用不同引物的扩增结果明显不同，如引物 OPX-19 的扩增条带数明显少于 OPX-04、OPX-06。

2.2 不同寄主和体色间烟蚜的遗传距离分析

各样品之间的遗传距离见表 3 至表 5。

Alaya^[12]报道了果蝇 *Drosophila willistoni* 和无脊椎动物群体间在不同阶段进化分歧时的

遗传趋异, 即遗传距离 D ($\bar{X} \pm SD$) 在不同阶段的值如下: 地方种群 0.031 ± 0.007 , 亚种 0.230 ± 0.016 , 端始种 0.226 ± 0.033 , 同胞种 0.581 ± 0.039 , 形态上不同的种 1.056 ± 0.08 。

表 3 引物 OPX-04 扩增结果的样品 A~K 的遗传距离

Table 3 Nei's genetic distance among samples generated by primer OPX-04

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
A	0										
B	0.1350	0									
C	0.0695	0.1268	0								
D	0.1256	0.1504	0.0861	0							
E	0.0823	0.1842	0.1233	0.0652	0						
F	0.0645	0.1400	0.1037	0.0396	0.0366	0					
G	0.0613	0.1396	0.0209	0.0780	0.1023	0.0942	0				
H	0.1496	0.0732	0.0989	0.0941	0.1320	0.1144	0.1502	0			
I	0.0424	0.1533	0.0491	0.0833	0.0911	0.0702	0.0396	0.1071	0		
J	0.0455	0.1293	0.0935	0.0843	0.0410	0.0460	0.0730	0.0843	0.0402	0	
K	0.1041	0.1479	0.0704	0.1099	0.1198	0.1054	0.0558	0.0695	0.0481	0.0441	0

表 4 引物 OPX-06 扩增结果的样品 A~K 的遗传距离

Table 4 Nei's genetic distance among samples generated by primer OPX-06

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
A	0										
B	0.0603	0									
C	0.0956	0.0552	0								
D	0.0598	0.1157	0.1003	0							
E	0.0416	0.0819	0.0666	0.0193	0						
F	0.0507	0.0731	0.0468	0.0246	0.0202	0					
G	0.0560	0.0247	0.0406	0.0747	0.0614	0.0451	0				
H	0.0623	0.0277	0.0359	0.1052	0.1071	0.1144	0.0941	0			
I	0.0823	0.1842	0.1233	0.1023	0.0991	0.0366	0.0652	0.1320	0		
J	0.0455	0.1293	0.0935	0.0703	0.0402	0.0460	0.0843	0.0843	0.0410	0	
K	0.1041	0.1479	0.0704	0.0558	0.0481	0.1054	0.1099	0.0695	0.1198	0.0441	0

从表 3 至表 5 可看出, 样品 A~K 的遗传距离 $0.031 < D < 0.230$, 参照上述标准, 则表明我国烟草上烟蚜不论是地理还是体色的分化均在种群水平上, 并未达到亚种的水平。

因为烟蚜在地理和体色上均存在着分化, 故需将二者分开分析。从体色看, 红色 A、D、G 中, D 吉林的分化最大; 黄绿色 B、E、H、K 中, 引物 OPX-04 的扩增结果中 E 吉林的分

化最大，K 湖南次之；引物 OPX-06 和 OPX-19 的扩增结果中 K 湖南的分化最大，E 吉林次之；褐色 C、F、I、J 中，引物 OPX-04 的扩增结果中 F 吉林的分化最大，J 湖南次之；引物 OPX-06 和 OPX-19 的扩增结果中 J 湖南的分化最大，F 吉林次之；这说明同一体色中，烟蚜存在地理分化。从同一地区看，黄绿色烟蚜（B、E、H、J）与红、褐色（A、C、D、F、G、I、K）之间的差异大。上述结果说明，我国烟草上烟蚜在地理种群的分化以吉林和湖南种群的分化较大，而江苏和河南间差异较小；体色种群的分化中红、褐色差异较小，二者与黄绿色差异较大。

表 5 引物 OPX-19 扩增结果的样品 A~K 的遗传距离

Table 5 Nei's genetic distance among samples generated by primer OPX-19

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
A	0										
B	0.0426	0									
C	0.0550	0.0952	0								
D	0.0654	0.0924	C	0.0510	0						
E	0.0675	0.0585	0.1188	0.0979	0						
F	0.0221	0.0610	0.0685	0.0846	0.1028	0					
G	0.0511	0.0838	0.0484	0.1018	0.0985	0.0343	0				
H	0.0420	0.0520	0.0669	0.1072	0.0440	0.0616	0.0612	0			
I	0.0779	0.1850	0.0993	0.1278	0.2063	0.0602	0.0666	0.1416	0		
J	0.0780	0.1692	0.1031	0.0930	0.1234	0.0933	0.1068	0.0885	0.0768	0	
K	0.0450	0.1634	0.1078	0.0883	0.1241	0.0815	0.1423	0.1001	0.1172	0.1000	0

2.3 样品间 SI 及 D 的聚类分析

对 A~K 11 个样品中的每一个样品的 8 个个体 SI 和 D 的平均值用 SAS (6.04) 中 12 种聚类方法进行聚类分析，尽管各种聚类方法在绘图时各样品的次序有所不同，但聚类结果基本一致，平均聚类法的聚类结果见图 5~图 10。

图 5 表明，当 $\lambda = 0.94$ 时，引物 OPX-06 的扩增结果用 SI 值聚类，可分为三类，即 I= {A、J、B、H、G、I、K}，为中南部地区的烟蚜；II= {D、E、F}，为吉林烟蚜；III= {C}，为河南褐色烟蚜，这就将吉林的烟蚜与其余分开，说明该引物可反应出烟蚜地理种群之间的 DNA 多态性差异。

引物 OPX-06 的 D 值聚类结果见图 6。从图 6 可看出，当 $\lambda = 0.50$ 时，J 和 K 聚为一类，D、E 和 F 聚为一类，即同样可区分地区差异，而中部地区的烟蚜则规律性不强。

图 7 表明，当 $\lambda = 0.96$ 时，引物 OPX-19 扩增结果的 SI 聚类可分为四类，I= {A、J、I、C、G} 为红、褐色，II= {B、H} 为黄绿色，III= {D、E、F} 为吉林烟蚜，IV= {K} 为黄绿色。从这些类群可看出，该引物可将营全周期生活史的烟蚜与其它烟蚜分开，而在不全周期和两种生活史混合发生的烟蚜中，又可按体色分开，且红褐色为一类，黄绿色为一类。

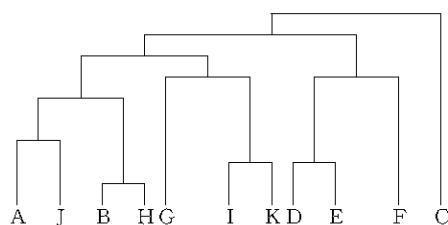


图 5 引物 OPX-06 扩增结果的 SI 值聚类图
Fig. 5 Dendrogram generated by cluster analysis of similarity index using primer OPX-06

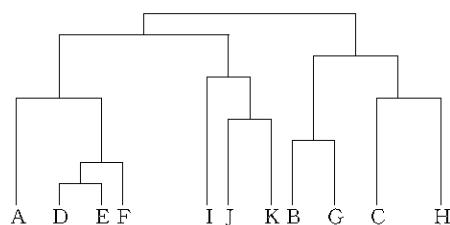


图 6 引物 OPX-06 扩增结果的 D 值聚类图
Fig. 6 Dendrogram generated by cluster analysis of genetic distance using primer OPX-06

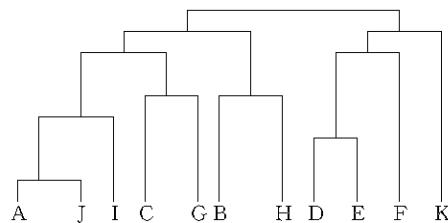


图 7 引物 OPX-19 扩增结果的 SI 值聚类图
Fig. 7 Dendrogram generated by cluster analysis of similarity index using primer OPX-19

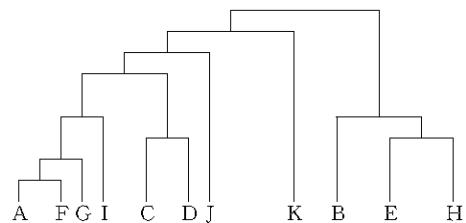


图 8 引物 OPX-19 扩增结果的 D 值聚类图
Fig. 8 Dendrogram generated by cluster analysis of genetic distance using primer OPX-19

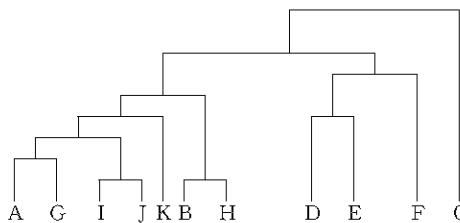


图 9 引物 OPX-04 扩增结果的 SI 值聚类图
Fig. 9 Dendrogram generated by cluster analysis of similarity index using primer OPX-04

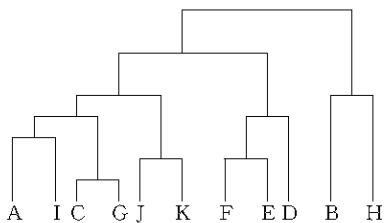


图 10 引物 OPX-04 扩增结果的 D 值聚类图
Fig. 10 Dendrogram generated by cluster analysis of genetic distance using primer OPX-04

图 8 表明, 当 $\lambda=0.90$ 时, 引物 OPX-19 扩增结果的 D 聚类可将样品分为四类, I= {A、F、G、I、C、D} 为红褐色, II= {J} 褐色和 III= {K} 黄绿色, IV= {B、E、H} 为黄绿色。同时可看出, 同一引物的扩增结果, 其 SI 值和 D 值的聚类结果并不一致, 故其分类效果也不相同。

引物 OPX-04 的扩增结果的 SI 值和 D 值的聚类结果分别见图 9 和图 10。从图 9 可以看出, 当 $\lambda=1.10$ 时, 可将样本分为三类, 即 I= {A、G、I、J、K、B、H} 为中南部地区的烟蚜, II= {D、E、F} 为吉林的烟蚜, III= {C} 为河南褐色烟蚜。图 10 中, 当 $\lambda=0.80$ 时, 样本分为四类, I= {A、I、C、G} 为中部地区红褐色烟蚜, II= {J、K} 为湖南郴州

的烟蚜, III= {D、E、F} 为吉林的烟蚜, IV= {B、H} 为中部黄绿色烟蚜。

以上结果说明: 在 DNA 水平上, 与完全周期生活史的烟蚜(来自北方)相比, 完全周期和不完全周期生活史混合发生的烟蚜(来自中部地区)与不完全周期生活史的烟蚜(来自南方)更为接近, 而两种生活史混合发生的烟蚜之间无明显差异。从体色看, 红色比黄绿色更接近褐色。

3 讨论

(1) 本研究所用烟蚜的 DNA 提取方法效果好, 易于操作, 可为其它蚜虫和小型昆虫所借鉴。在 DNA 扩增产物的分析中, 相似性指数和 Nei 的遗传距离均可使用, 但二者的结果有差异, 这就需要根据研究的对象和目的来选择。

(2) 本研究结果表明, RAPD 方法可显示出烟蚜的地理差异和体色差异。但由于同一引物在同一群体的不同个体之间有差异, 故上述烟蚜的差异只有在群体水平上才有意义, 而在个体水平上意义不大。

(3) 本研究在结果分析中仅考虑了带的有无和带的位置, 而没有考虑带的强度(包括亮度和宽窄)。本研究结果同时表明, 尽管许多带为共有带, 但其亮度差异很大, 这部分信息的损失可能造成一些分析偏差。另外, 目前对 RAPD 的分析, 主要是聚类分析, 而这种方法对类的划分随意性太大, 因而尚需在分析方法上进一步完善。

(4) RAPD 方法虽然能够揭示昆虫生物型之间的差异, 但当无特征带出现时, 能同时将不同种和同一种的亚种与生物型在一起研究, 就可根据相对差异大小进而判断生物型的分化程度。

致谢 本试验在样本采集中得到了吉林农业大学伊伯仁教授、湖南省郴州地区烟草公司陈传孟高级农艺师、河南省烟草公司宜阳分公司何万泽先生的大力支持。RAPD-PCR 技术得到了中国科学院动物所昆虫分子生物学实验室全体同志的帮助, 作者在此谨向他们表示衷心感谢!

参 考 文 献 (References)

- 1 Rajagopal R. Studies on the development and metamorphosis of *Myzus persicae* (Sulzer) by cross inoculation among different host plants. Prankee, 1983, (4): 126~133
- 2 王茂涛, 张孝羲. 桃蚜体色生物型的研究. 植物保护学报, 1991, 18 (4): 351~355
- 3 杨效文, 马继盛等. 不同寄主植物对烟蚜种群增长的影响. 见: 河南农业大学农业昆虫研究室编. 中国烟草昆虫研究: 理论与实践 (一). 北京: 中国农业出版社, 1995, 128~131
- 4 Lampert E P. Seasonal abundance and within-plant distribution of aphids (Homoptera: Aphididae) on flue-cured tobacco. J. Econ. Entomol., 1989, 82 (1): 114~118
- 5 Harlow C D, Southern P S, Lampert E P. Geographic distribution of two color forms, carboxylesterase activity, and chromosome configuration of the tobacco aphid (Homoptera: Aphididae) in North Carolina. J. Econ. Entomol., 1991, 84 (4): 1 175~1 179
- 6 Tamaki G, Amis B, Fox L et al. Comparison of yellow holocyclic and green anholocyclic strains of *Myzus persicae* (Sulzer): Low temperature adaptability. Environ. Entomol., 1982, 11: 231~233

- 7 Blackman R L. Chromosomal rearrangement involved in insecticide resistance of *Myzus persicae*. *Nature*, 1978, 271: 450~452
- 8 Ballinger M E, Black IV W C, Miller B R. Use of genetic polymorphisms detected by the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) for differentiation and identification of *Aedes aegypti* subspecies and populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1992, 47 (6): 893~901
- 9 Haymer D S, McInnis D Q. Resolution of population of the Mediterranean fruit fly at the DNA level using random primers for the polymerase chain reaction. *Genome*, 1994, 37: 244~248
- 10 Edwards O R, Marjorie A H. Polymorphism in two parasitoids detected using random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Biol. Control*, 1993, 3: 243~257
- 11 Williams C L. Geographical origin of an introduced insect pest, *Listronotus bonariensis* (Kuschel), determined by RAPD analysis. *Heredity*, 1994, 72: 412~419
- 12 Ayala F J. Genetic differentiation during the speciation process. *Evol. Biol.*, 1975, 8: 1~78

RAPD-PCR ANALYSIS OF POPULATION DIFFERENTIATION OF GREEN PEACH APHID IN CHINA

Yang Xiaowen Zhang Xiaoxi

(Department of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Chen Xiaofeng Wang Ying

(Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract RAPD-PCR was used to detect the population differentiation of green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) on tobacco from different regions in China, and the results showed that the use of different primers in the RAPD method permits detection of different levels of DNA polymorphism in the aphid's population. Nei's genetic distance (D) shows that the differentiation of the aphid from tobacco is only at population level instead of subspecies or species level. Three primers screened from nineteen were used for cluster analysis based on similarity index (SI) and Nei's genetic distance (D). Although there exist some differences between the cluster results of SI and D , they both can show the DNA differences of geographic populations and color forms of the aphid. At DNA level, compared with the holocyclic aphids (from northern China), the aphids mixed with holocyclic and anholocyclic life cycles (from central China) are more similar to the anholocyclic aphids (from southern China), but there is no obvious difference among the aphids from central China. The results also show that, compared with yellowish-green forms, the red forms are more similar to the brown ones of the aphid.

Key words *Myzus persicae* (Sulzer), RAPD-PCR, similarity index, genetic distance, population differentiation