

棉蚜 (*Aphis gossypii*) 种群寄主分化和季节分化的微卫星引物 PCR 研究

龚 鹏¹, 杨效文², 张孝羲¹, 刘向东¹, 陈晓峰²

(1. 南京农业大学植保系, 南京, 210095; 2. 中国科学院动物研究所, 北京, 100080)

摘要:通过对棉蚜群体进行室外观察、室内培养和分子遗传标记的 DNA 多态性分析(用 3 个微卫星序列为引物进行 PCR)等研究,结果表明:1. 冬寄主(木槿、石榴和花椒)上棉蚜种群分化较小(种群相似性指数在 0.833~0.917 之间),而冬寄主种群和夏寄主(棉花和南瓜)种群之间较大的分化(种群相似性指数在 0.589~0.756 之间)。2. 棉蚜自然种群是由体色不变的生物型(干母为黄色,其后代始终为黄色)和体色可变量生物型(干母为绿色,其后代有绿色和黄色两种体色)组成的混合种群。3. 黄色小型蚜(伏蚜)来源于混合类群,但主要来自绿色干母多代选择分化的黄色后代,也有小部分可能来自干母黄色的体色不变型。

关键词:棉蚜; 微卫星引物; PCR; DNA 多态性; 种群分化

Microsatellite primer-PCR studies on the population differentiation of *Aphis gossypii* in relation to host plants and seasons

GONG Peng¹, YANG Xiao-Wen², ZHANG Xiao-Xi¹, LIU Xiang-Dong¹, CHEN Xiao-Feng² (1. Nanjing Agricultural University, Nanjing, 210095, China; 2. Institute of Zoology, Academia Sinica, Beijing 100080, China)

Abstract: The present study investigated the differentiation of *Aphis gossypii* in relation to host plants and seasons. This analysis, based on field investigation, lineage breeding and microsatellite primer-PCR, showed that populations of *A. gossypii* from three overwinter host plant species, Hibiscus *Hibiscus syriacus*, Pomegranate *Punica granatum* and Chinese prickly ash *Zanthoxylum simulans*, were closely related to a pair-wise similarity index ranging from 0.833 to 0.917, suggesting a low level of differentiation among them. But a high level of differentiation was found between the populations from overwinter hosts and summer hosts, cotton *Gossypium hirsutum* and pumpkin *Cucurbita pepo*, pair-wise similarity index ranging from 0.589 to 0.756. The field population of *A. gossypii* may be consist of two genetically-determined body colour forms, i. e. unchangeable yellow form and changeable green form. The former is always yellow both in fundatrix and its parthenogenetic offsprings, but in the latter, green fundatrix can produce both green and yellow offsprings. The dwarf forms of *A. gossypii* on cotton in summer may come from both green fundatrix and yellow one, but the majority of them may come from the former.

Key words: *Aphis gossypii* Glover; microsatellite primers; PCR; DNA polymorphism; population differentiation

文章编号:1000-0933(2001)05-0765-07 中图分类号:Q969.36+7.3.S435.622+.1 文献标识码:A

棉蚜 (*Aphis gossypii*) 属同翅目(Homoptera)蚜科(Aphididae)蚜属(*Aphis*), 分布于我国和世界各地。棉蚜属多食性害虫, 能在不同科的寄主植物, 包括很多亲缘关系很远的植物取食为害。现已记载的棉蚜的寄

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39630210)

收稿日期: 1999-11-06 修回日期: 2000-08-15

作者简介: 龚 鹏(1972~), 女, 陕西西安人, 博士。主要从事昆虫分子生物学研究。

主植物已有 285 种,属于 75 科,而且世界各地不断又有棉蚜新寄主的报道。棉蚜在不同的地区取食的主要植物有所不同,同一地区不同时间取食的主要植物也有所差异。一些研究已表明,棉蚜种群类群的形态特征和生态参数在寄主之间有差异^[1~4]。棉蚜在有的寄主上似乎已形成了寄主专化型,而且,这些寄主专化型在寄主转移中可能有其纵向适应的固定路线。张克斌的寄主转接实验表明,不同冬寄主上越冬的棉蚜其夏寄主范围不同^[5]。Inaixumi 根据冬、夏寄主之间的转换将日本的棉蚜分为 4 个生物型^[6]。而 Wool 等报道在澳大利亚棉蚜虽然在不同寄主上存活率有变化,但没有绝对的寄主专化型^[7]。

自然条件下,棉蚜的体色呈现多态性,有墨绿、绿、浅绿、浅黄、米黄等。不同体色的棉蚜在田间随季节其比例有所变化。盛夏在棉田常出现黄色小型蚜为害成灾,人们习惯的把它称为“伏蚜”。这种蚜虫体型只有春季发生时的 1/2 大小,由绿色变为淡黄甚至黄白色,附肢变短,有翅蚜触角第 3 节的感觉圈也由 6~8 个减少为 2~5 个。汪世泽等就棉蚜体色变化提出了“季节生物型”的概念,将棉蚜分为苗蚜和伏蚜两个生物型^[8]。赵惠燕等用实验生态学方法研究了棉蚜体色变化机理^[9]。纵观国内外对棉蚜的研究未见在 DNA 水平上对其种群分化的研究报道,本研究用微卫星引物 PCR 扩增方法,对不同寄主上棉蚜以及不同季节的棉蚜的种群分化进行研究,以便为深入探讨该虫的成灾机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 越冬寄主木槿上棉蚜体色变化调查

从 3 月初开始,在南京农业大学校园里选取 3 个不同点的木槿,连续调查,每个点随机调查 40~60 个芽苞,记录各色蚜量以观察越冬寄主上棉蚜体色的变化。

1.2 室内饲养棉蚜体色变化

在木槿上采集刚从卵孵化出的绿色和黄色干母蚜(见卵壳),分别用笼罩罩在扦插的木槿枝条上连续饲养(25℃, 14D:10L)。观察其后代的体色变化。

1.3 棉蚜样品采集与保存

本实验用于 DNA 多态性分析的棉蚜样品见表 1,采自室外的棉蚜,均在间距 1m 以上的植株上分散采集,以保证每头棉蚜来自不同的克隆。室内培养的棉蚜用笼罩隔离。样品采集于盛有无水乙醇的 1.5 ml 离心管, -20℃ 保存。

1.4 棉蚜基因组 DNA 提取

将 30 头棉蚜装入 1.5ml 离心管,置液氮中冷冻 10min,取出捣碎后加入 1×STE 缓冲液 500ul, 10mg/ml 蛋白酶 15ul, 20%SDS12.5ul, 混匀后,置于 55℃ 保温 8h 以上。然后,依次用等体积的 Tris 饱和酚、酚/氯仿/异戊醇和氯仿/异戊醇抽提,加入冰冷的无水乙醇 900ul 和 3M 醋酸钠(pH7.0)50ul, 混匀后置于 -20℃ 0.5h; 12000 r/min 离心,用 70%乙醇洗涤 1 次, 37℃ 干燥后,加入 TE(pH8.0)100ul 室温下溶解 DNA。待 DNA 溶解后,加入 1mg/ml 的 RNA 酶 20ul 置于 37℃ 1h。DNA 于 -20℃ 保存待用。

1.5 微卫星引物 PCR 扩增

扩增反应液含模板 DNA(棉蚜基因组 DNA) 3ul, 微卫星引物 15ng, dNTP 5mM, Taq 酶 1.5 单位, 10×buffer(含 Mg 离子), 用双蒸水加至 25ul, 加石蜡油 25ul。

PCR 扩增在 PE480 DNA 扩增仪上进行,条件为 94℃ 5min,后进行 45 个循环,即 94℃ 1min、退火 1min、72℃ 2min,最后在 72℃ 延伸 10min,保存于 4℃。本研究选用的 3 种微卫星引物(由北京赛百盛生物工程公司合成)及其 PCR 扩增反应的最适退火温度见表 2。其中 33.15 微卫星核心序列广泛存在于动物基因组中,且在多种动物中该微卫星位点呈现多态性。而(GATA)₄和(CAC)₅是从棉蚜基因组中克隆得到的微卫星序列,这两个微卫星位点在棉蚜中呈现高度的多态性^①。

1.6 结果计算

将 PCR 扩增后的 DNA 在 1.2%琼脂糖胶上电泳,电压 70V,电泳缓冲液为 1×TAE。读带后计算相似

性指数(SI):

$$SI = 2N_{AB}/(N_A + N_B)$$

N_A :类群 A 的带数, N_B :类群 B 的带数, N_{AB} : A 和 B 两个类群的共有带数。

将 3 个微卫星引物 PCR 扩增结果的相似性指数进行平均,然后将平均相似性指数的矩阵用 1-SI 换算成距离矩阵,再用 SAS(V. 6. 04)软件中的平均聚类法进行聚类分析。

表 1 本研究所用棉蚜样品
Table 1 Samples of cotton aphid included in the study

种群 Population	寄主植物 Host plant	蚜型 Morph	体色 Body color	采集时间 Collection date	采集地点 Collection location
A	木槿 Hibiscus	孤雌蚜 Virginoparae	绿色 Green	1999. 04 April, 1999	南京农大
B	石榴 Pomegranate	孤雌蚜	绿色	1999. 04 April, 1999	南京农大
C	花椒 Chinese prickly ash	孤雌蚜	绿色	1999. 04 April, 1999	河南新乡
D	南瓜 Pumpkin	孤雌蚜	绿色	1999. 05 May, 1999	南京农大
E	棉花 Cotton	孤雌蚜	绿色	1999. 05 May, 1999	南京农大
F	棉花(田间秋季) Cotton	孤雌蚜	黄色 Yellow	1998. 09 Sept. 1998	南京农大
G	棉花(田间秋季) Cotton	孤雌蚜	绿色	1998. 09 Sept. 1998	南京农大
H	棉花(田间夏季) Cotton	小型蚜 Dwarf form	黄色	1998. 07 July, 1998	南京农大
I	棉花(田间春季) Cotton	孤雌蚜	黄色	1999. 05 May, 1999	南京农大
J	棉花(田间春季) Cotton	孤雌蚜	绿色	1999. 05 May, 1999	南京农大
K	木槿	孤雌蚜	黄色	1999. 05 May, 1999	室内饲养
L	木槿	孤雌蚜	黄色	1999. 05 May, 1999	室内饲养
M	木槿	干母 Fundatrix	黄色	1999. 03 Mar. 1999	南京农大
N	木槿	干母	绿色	1999. 03 Mar. 1999	南京农大

注:K 为绿色干母 N 单雌培养 10 代的黄色后代,L 为黄色干母 M 单雌培养 10 代的黄色后代。

表 2 本研究所用的微卫星引物 Table 2 The microsatellite primers used in the study		
微卫星引物 Microsatellite primers	碱基序列 Sequence (5'—3')	退火温度 (C) Annealling temperature
33. 15 core sequence	5'—AGAGGTGGGC AGGTG—3'	54
	(GATA) ₄ 5'—GATAGATAGAT AGATA—3'	36
(CAC) ₅	5'—CACCACCACC ACCAC—3'	57

2 结果与分析

2. 1 越冬寄主木槿上棉蚜的体色变化

观察记录的越冬寄主木槿上棉蚜体色的变化见表 3。结果表明,木槿上棉蚜在卵孵化初期黄色蚜比例极低,随时间推移逐代繁殖后,黄色棉蚜在种群中的比例逐渐增大。

2. 2 室内饲养棉蚜的体色变化

黄色和绿色干母蚜在室内连续饲养(25℃, 14D:10L),其后代的体色变化如图 1 所示。

黄色干母在室内连续培养 3 代,其后代的体色

始终 100%为黄色(图 1a);绿色干母,其后代可分化为黄色和绿色两种体色,在 25℃,14D:10L 条件下对绿色棉蚜后代连续单向选择培养, F₀ 至 F₃ 代,绿色母蚜产黄色后代的比例始终为 30%左右(图 1b)。

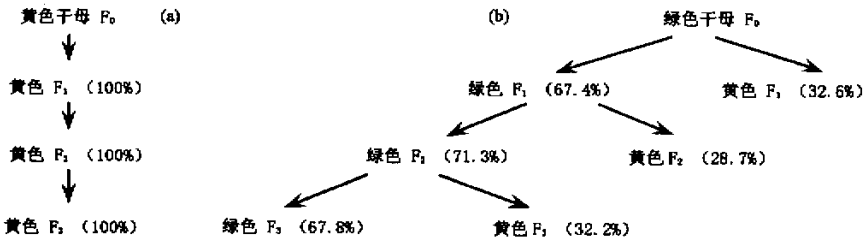


图 1 棉蚜家系选择培养中的体色变化

Fig. 1 The variation of body colors during the selective clone breeding

通过棉蚜家系单向选择培养试验说明,棉蚜在冬寄主上的干母开始便明显存在有体色不变的黄色生物型和体色可变的生物型(干母为绿色,其后代有绿色和黄色两种体色)。

2.3 微卫星引物对棉蚜不同类群(不同寄主和不同季节型)的 PCR 扩增结果

33.15 核心序列对棉蚜的扩增片段的大小在 648bp~3199bp 之间, (GATA)₄ 对棉蚜的扩增片段的大小在 564bp~2817bp 之间, (CAC)₅ 对棉蚜的扩增片段的大小在 705bp~3034bp 之间, 这几种类群棉蚜扩增图谱的差异表现在扩增条带的有无和明暗、宽窄上(图 2、图 3)。

表 3 木槿上棉蚜不同色型个体的数量变化(南京 1999)

Table 3 Numerical change of cotton aphids with different body-color on Hibiscus

时间 Date Mon. /day)	芽苞数 (个) No. of bud	总蚜数 (头) No. of aphids	绿色蚜 数(头) No. of green aphids	黄色蚜 数(头) No of yellow aphids	黄色蚜所 占百分率 Porp. of yellow aphids
3/15	126	81	81	0	0
3/22	281	789	787	2	0.25%
4/2	129	711	675	36	5.06%
4/11	210	1663	1259	404	24.29%

2.4 棉蚜的相似性指数及聚类分析

冬寄主木槿、石榴和花椒上 3 个棉蚜种群间相似性指数范围:0.833~0.917,而冬寄主种群和夏寄主种群之间相似性指数范围:0.589~0.756。夏寄主棉花和南瓜上两个棉蚜种群之间相似性指数为 0.722 (表 4)。

从图 4 看出,聚类的第 1 步,木槿和花椒上的棉蚜最先聚在一起($\lambda = 0.278$),其次是石榴上的棉蚜与第 1 步结果相聚($\lambda = 0.533$),然后,两种夏寄主第 2 步与第 3 步的聚类结果相聚($\lambda = 1.189$)。

上述结果表明,棉蚜在冬寄主(木槿、石榴和花椒)种群之间分化较小,而其在冬寄主和夏寄主之间种群有较大的分化。同时,棉蚜的两个夏寄主(棉花和南瓜)种群之间也有较大的分化。

图 5 的聚类分析表明了不同季节和不同体色棉蚜种群类群的相似性及其亲疏关系。第 1 步,棉花上的黄色小型蚜与木槿上绿色干母经多代选择分化的黄色后代最先聚在一起 ($\lambda = 0.148$), 其次是黄色干母与

表 4 不同寄主棉蚜的平均相似性指数

Table 4 Average similarity index of cotton aphids from different host plants

	A	B	C	D	E
A	1				
B	0.833	1			
C	0.917	0.85	1		
D	0.589	0.642	0.622	1	
E	0.756	0.617	0.672	0.722	1

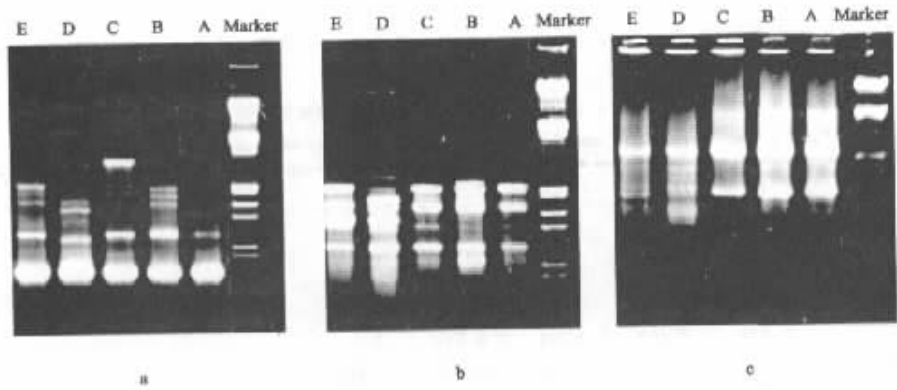


图2 微卫星引物对不同寄主上棉蚜的PCR扩增结果
Fig.2 PCR results of microsatellite primer to cotton aphids from different host plants
a 33.15 core sequence, b (GATA)₄, c (CAC)₅

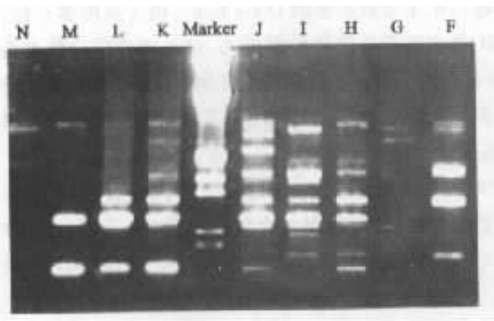


图3 微卫星引物(33.15 core sequence)对不同季节不同体色棉蚜的PCR扩增结果
Fig.3 PCR results of microsatellite primer(33.15 core sequence) to cotton aphids with different body colors at different seasons

从图5的聚类分析所表明的不同季节不同体色棉蚜的遗传关系中可得出以下3个结论:(1)干母为黄色的棉蚜连续在室内选择培养10代,其后代的体色始终仍为黄色(L),与自然种群中亲代黄色干母(M)遗传关系最近,说明棉蚜种群中存在有一种体色始终为黄色的生物型。(2)棉蚜自然种群是由体色不变生物型(干母为黄色,其后代始终为黄色)和体色可变量生物型(干母为绿色,其后代的体色可进行黄色和绿色的相互转化)组成的混合种群。(3)黄色小型蚜(伏蚜)与干母为绿色的体色可变量的黄色后代关系最密切,而与绿色干母反为数据也说明黄色小型蚜是绿色干母经多代选择分化为黄色后才形成。另外,小型蚜也与干

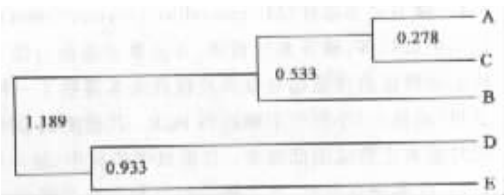


图4 不同寄主的棉蚜平均相似性指数的聚类分析
Fig.4 Dendrogram generated by cluster analysis of similarity index among cotton aphids from different host plants
A 木槿上的棉蚜, C 花椒上的棉蚜, B 石榴上的棉蚜, D 南瓜上的棉蚜, E 棉花上的棉蚜

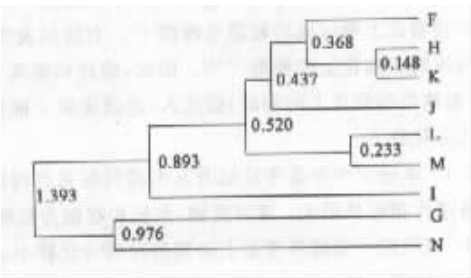


图5 不同季节不同体色棉蚜间相似性指数的聚类分析
Fig.5 Dendrogram generated by cluster analysis of similarity index among cotton aphids with different bodycolors at different seasons

母黄色的体色不变型棉蚜归为同一大类群,因此认为黄色小型蚜来源于混合类群,但主要来自绿色干母经多代选择分化的黄色后代,也有小部分可能来自干母黄色的体色不变型。至于其遗传和环境影响的机制还有待进一步研究。

表 5 不同季节不同体色棉蚜间的相似性指数
Table 5 Similarity index among cotton aphids with different bodycolors in different seasons

	F	G	H	I	J	K	L	M	N
F	1								
G	0.250	1							
H	0.833	0.000	1						
I	0.615	0.222	0.615	1					
J	0.714	0.400	0.714	0.533	1				
K	0.727	0.000	0.909	0.500	0.769	1			
L	0.600	0.000	0.800	0.364	0.667	0.889	1		
M	0.444	0.000	0.667	0.200	0.545	0.750	0.857	1	
N	0.444	0.400	0.222	0.400	0.182	0.000	0.000	0.000	1

3 讨论

- 3.1 微卫星多态性(Microsatellite polymorphism)是近几年才发展起来的 DNA 标记。由于高度多态性,等位基因数目多,呈等显性遗传,并且其多态性可用 PCR 技术结合电泳被检测出来,这一遗传标记技术为分析生物群体遗传结构与变异及彼此关系提供了一种强有力的工具。本研究结果证明用 10~20 个碱基的微卫星(或核心)序列作引物进行 PCR,其检测的 DNA 多态性位点与 RAPD 相比其稳定性和重复性都很好,同时成本比指纹图低得多,在昆虫学研究中,是一种较为理想的分子遗传标记方法。
- 3.2 许多研究表明,寄主植物种类和温度是蚜虫进化的主要选择因素^[10]。在地球上不同的温区,同一种蚜虫存在不同生活史类型^[11];在同一温区由于植物相的差异,同一种蚜虫可在食性上有所分化^[12,13]。本研究结果表明,棉蚜的冬寄主种群之间分化较小(表 4),这与其生活史及性蚜的产生方式有关。冬寄主上的棉蚜均可进行有性生殖,但雄蚜在夏寄主上产生,而性雌蚜则在冬寄主上产生^[14],所以棉蚜在交配之前,雄蚜必须经过飞行并找到性雌蚜,这样大大增加了棉蚜的基因重组和交流的机会,降低了其遗传分化程度。同一冬寄主上的性雌蚜可与来自不同夏寄主的雄蚜交配,这可能是棉蚜冬寄主种群之间分化程度低的主要原因。本研究结果同时表明,棉蚜的夏寄主种群和冬寄主种群之间遗传差异较大(表 4),这可能与棉蚜的寄主转移通道有关。一方面,棉蚜在冬、夏寄主之间存在着寄主转移;另一方面其在夏寄主之间也存在寄主转换。同时,棉蚜在某些夏寄主之间的转换存在不对称性,如棉蚜从棉花转到黄瓜上难以建立种群,但从黄瓜转到棉花上则可成功地建立种群^[12]。有研究表明:棉蚜在一些夏寄主上已形成了特殊的遗传型,如黄瓜上的棉蚜和菊花上的棉蚜^[12,13]。因此,棉花和南瓜上的棉蚜除了来自冬寄主,也可能有一些特殊遗传型棉蚜(如黄瓜和菊花上的棉蚜)的加入,这就造成了棉花上的棉蚜、南瓜上的棉蚜以及二者与冬寄主上的棉蚜遗传分化较大。
- 3.3 本研究中冬寄主花椒及其上的棉蚜采自河南新乡。从结果分析看来,它与采自江苏南京木槿上的棉蚜遗传相似性最大。黄河流域,木槿和花椒为棉蚜的主要越冬寄主,而长江流域,木槿为棉蚜的主要越冬寄主,说明在主要越冬寄主上的棉蚜种群分化较小。花椒属北方树种,在长江流域极少种植,笔者曾在南京中山植物园内的花椒上采得少量棉蚜,将其与南京地区棉蚜的几种主要冬夏寄主上的棉蚜一起用 RAPD 方法进行 DNA 多态性分析,结果显示这种非适生区花椒上的棉蚜与其他寄主上的棉蚜遗传分化较大(另文发表),其中的原因尚待进一步研究。
- 3.4 本研究结果表明:在 DNA 水平上分析,棉蚜的黄色小型蚜(伏蚜)主要来自体色可变型的种群类群。小型蚜与正蚜在体色和体型大小上的差异可能是在环境因素影响下的基因表达和调控水平的差异。同时经田间观察、室内饲养和分子遗传学研究表明,棉蚜的色型呈现的多态性,是由体色不变的生物型(干

母为黄色,其后代始终为黄色)和体色可变型生物型(干母为绿色,其后代有绿色和黄色两种体色)组成了混合种群。由于前者在整个棉蚜干母种群中所占的比例很小,其在整个棉蚜种群中所起的作用,以及其与后者在有性阶段的关系(是否交配产卵及其后代的体色变化规律)和无性阶段的关系(如竞争或共生)均需进一步研究。

参考文献

- [1] Ferrandiz P R and Gutierrez P F. Reproduction and development of the aphid *Aphis gossypii* under controlled conditions. *Ciencias de la Agricultura*, 1986, **27**: 51~54.
- [2] Ullah K. Biological study of cotton aphid, *Aphis gossypii* Glov. *Pakistan Journal of Agricultural Research*, 1982, **1**(2): 135~138.
- [3] Shim J Y, Park J S and Paik W H. Studies on the life history of cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover (Homoptera). *Korean Journal of Plant Protection*, 1982, **18**(2): 85~88.
- [4] Moursi K S, Donia A A, Mesbah H A, *et al.* Comparative biological studies of *Aphis gossypii* Glov. on different host plants. *Annals of Agricultural Science*, 1985, **23**(2): 895~899.
- [5] 张克斌, 刘惠霞, 王玲莉. 棉蚜年生活周期及其与寄主营养的关系. *西北农业大学学报*, 1987, **15**(4): 15~21.
- [6] Inaixumi M. Life cycle of *Aphis gossypii* Glover (Homoptera, Aphididae) with special reference to biotype differentiation on various host plants. *Kontyu*, 1981, **49**(1): 219~240.
- [7] Wool D, Hales D and Sunnucks P. Host plant relationships of *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae) in Australia. *J Australian Entomological Society*, 1995, **34**(3): 265~271.
- [8] 汪世泽, 赵惠燕, 董应才. 棉蚜体色分化与季节生物型问题. *西北农学院学报*, 1983, **2**: 9~23.
- [9] 赵惠燕, 张改生, 汪世泽. 再探棉蚜体色变化的生态遗传学机理. *生态学报*, 1993, **13**(1): 9~16.
- [10] Hales D F, Tomiuk J, Wohrmann K, *et al.* Evolutionary and genetic aspects of aphid biology: a review. *European Journal of Entomology*, 1997, **94**: 1~55.
- [11] Moran N A. The evolution of aphid life cycles. *Ann. Rev. Entomol.*, 1992, **37**: 321~348.
- [12] Zhang G X and Zhong T S. Experimental studies on some aphid life — cycles and the hybridization of two sibling species. In: Campbell RK & Eikenbary RD eds. *Aphid-plant genotype interactions*. Elsevier, Amsterdam, 1990. 37~50.
- [13] Guildemond J A, Tigges W T and De Vrijer PWF. Host races of *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) on cucumber and chrysanthemum. *Environ. l Entomol.*, 1994, **23**: 1235~1240.
- [14] 赵惠燕, 汪世泽, 张改生, 等. 棉蚜性蚜的研究. *昆虫知识*, 1994, **31**: 145~148.