

皱大球蚧 (*Eulecanium kuwanai*) 和瘤坚大球蚧 (*Eulecanium gigantean*) 地理种群的 RAPD 遗传分化

高宝嘉¹ 李 梦¹ 王春和² 高立杰¹

(1. 河北农业大学林学院, 保定 071000; 2. 保定市园林局, 保定 071000)

摘要 采用 RAPD 技术测定分析了河北省皱大球蚧和瘤坚大球蚧 8 个地理种群的遗传结构。结果表明 5 种引物在 8 个种群中共产生了 65 条 RAPD 标记, 各地理种群之间没有产生各自的特征标记, 不同种群间的遗传相似程度与其地理间距呈反比, 种群内的遗传相似程度比种群间高。Shannon 信息指数表明, 皱大球蚧的平均遗传多样性高于瘤坚大球蚧, 分别为 0.3456 和 0.3225, 说明物种不同, 其变异程度也不同。

关键词 皱大球蚧 瘤坚大球蚧 地理种群 RAPD 分析 遗传分化

文章编号: 1000-0933 (2007) 03-0918-06 中图分类号: Q963 文献标识码: A

RAPD analysis of genetic divergence among populations in *Eulecanium kuwanai* Kanda and *Eulecanium gigantean* Shinji

GAO Bao-Jia¹, LI Meng¹, WANG Chun-He², GAO Li-Jie¹

1 College of Forest, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China

2 Horticulture Administration of Baoding, Baoding 071000, China

Acta Ecologica Sinica 2007 27 (3) 0918 ~ 0923.

Abstract : Eight geographic populations of the scale insects *Eulecanium kuwanai* Kanda and *Eulecanium gigantean* Shinji, in Hebei Province were investigated by RAPD-PCR techniques for the determination of their genetic structures. Samples with 10 adults were examined for each population. Sixty five RAPD makers were found by using five selected primers. No specific band was observed for any population. The distance analysis shows that the similarity within an intraspecies population is higher than that of interspecies; the genetic similarity among different populations is inversely proportional to their geographic distances. Shannon's index showed that the average genetic diversity within populations in *Eulecanium kuwanai* Kanda was higher than that in *Eulecanium gigantean* Shinji, with a value of 0.3456 and 0.3225, respectively, demonstrating that the degree of genetic variation was diverse among different species.

Key Words : *Eulecanium kuwanai* Kanda; *Eulecanium gigantean* Shinji; geographic population; RAPD; genetic divergence

昆虫与其他生物一样, 在长期的生长发育和进化过程中保留了一些遗传特征, 使物种得以延续, 同时又存在一些变异, 以适应新的环境。这些遗传变异的特性不仅表现在昆虫的种间, 而且存在于同种昆虫的不同种

基金项目: 河北省博士基金资助项目

收稿日期: 2006-01-19; 修订日期: 2006-10-07

作者简介: 高宝嘉 (1958 ~) 男, 河北定州人, 博士, 教授, 主要从事生态学与森林有害生物治理研究. E-mail: baojiagao@163.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: baojiagao@163.com

Foundation item : The project was financially supported by the Doctorate Foundation of Hebei Province

Received date 2006-01-19; **Accepted date** 2006-10-07

Biography : GAO Bao-Jia, Ph. D., Professor, mainly engaged in ecology and forest pest management. E-mail: bdlimeng@163.com

群间^[1,2]。蚧虫作为一类较特殊的昆虫,种群分化尤为突出,蚧虫扩散能力比较弱,空间分布格局成聚集型^[3],在长期的系统发育过程中,生活在不同环境条件下的蚧虫种群,直接面临着环境的选择压力,形成了相对稳定的区系组成,因寄生不同地域或同一地域不同海拔而产生多型或双型现象^[4],地理种群间差异比较明显。目前有关蚧虫的分子系统学研究近年来有了较大的发展,如利用核DNA、mtDNA、rDNA和rRNA序列信息、RFLP等技术对蚧虫进行鉴定和系统学研究^[5~8],但未见从分子水平对其地理种群变异进行研究的报道。而研究蚧虫地理种群的遗传变异,可以揭示蚧虫种群的遗传背景、遗传多样性和遗传分化与其寄主植物、环境因素的相互关系,进而为探讨昆虫种群的遗传分化机制、种群间基因流和物种多样性保护提供理论依据。

本文采用RAPD技术对蚧科昆虫中的皱大球蚧和瘤坚大球蚧的8个地理种群遗传结构进行了测定和分析,现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫

于2005年4~5月间对皱大球蚧和瘤坚大球蚧的雌成虫进行了采集(采集时间、地点及种群代码见表1)。将采集的成虫饥饿2~3d,使其消化道内的物质充分消化,然后于无水乙醇中浸泡,-20℃条件下保存备用。

表1 材料来源
Table 1 Origin of the materials

种名 Species	采集地点 Sites	采集时间 Time	种群代码 Population cord
皱大球蚧 <i>Eulecanium kuwanai</i> Kanda	邯郸 Handan	2005 年 4 月 21 ~ 23 日	HZ
瘤坚大球蚧 <i>Eulecanium gigantean</i> Shinji	邯郸 Handan	2005 年 4 月 21 ~ 23 日	HL
皱大球蚧 <i>Eulecanium kuwanai</i> Kanda	石家庄 Shijiazhuang	2005 年 4 月 24 ~ 26 日	SZ
瘤坚大球蚧 <i>Eulecanium gigantean</i> Shinji	石家庄 Shijiazhuang	2005 年 4 月 24 ~ 26 日	SL
皱大球蚧 <i>Eulecanium kuwanai</i> Kanda	保定 Baoding	2005 年 4 月 27 ~ 29 日	BZ
瘤坚大球蚧 <i>Eulecanium gigantean</i> Shinji	保定 Baoding	2005 年 4 月 27 ~ 29 日	BL
皱大球蚧 <i>Eulecanium kuwanai</i> Kanda	承德 Chengde	2005 年 5 月 18 ~ 19 日	CZ
瘤坚大球蚧 <i>Eulecanium gigantean</i> Shinji	承德 Chengde	2005 年 5 月 18 ~ 19 日	CL

1.1.2 供试引物、试剂

本实验所用22种引物,Taq酶,dNTP均由宝生物工程(大连)有限公司生产。DNA标记为Marker DL2000,由保定海泰克生物技术有限公司生产。

1.2 实验方法

1.2.1 模板的提取

主要参照Boycey等的方法^[9],提取模板DNA。每个种群取1只,分别于TE缓冲液中浸泡3~5h,烘干,放入装有400μl预冷的2×CTAB(0.1mol/L Tris-HCl 1.4mol/L NaCl,0.2mol/L EDTA,0.2%β巯基乙醇,0.05mol/L CTAB,Ph8.3)的1.5ml离心管中。研碎,65℃水浴1h,用1000r/min离心15min,取上清液,加入等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)反复抽提两次,再经1倍体积的异丙醇沉淀1h,干燥后加入灭菌ddH₂O溶解,-20℃保存待用。

1.2.2 RAPD-PCR 扩增程序

参照Williams的方法^[10],PCR反应总体积25μl,各成分为10×PCR反应缓冲液2.5μl,dNTP(dATP+dCTP+dGTP+dTTP)2ul,引物(20ng/μl)1μl,灭菌ddh₂o17.375uL,模板DNA2μl,Taq酶0.125μl(0.625U)。扩增程序是94℃1min 92℃1min 37℃1min 72℃2min。步骤2~4循环45次,然后在72℃下延伸10min。

1.2.3 电泳检测

扩增产物用 1.3% 琼脂糖凝胶分离 ,电泳缓冲液为 0.5 × TBE ,上样量为 10μl。电泳结束后以溴化乙锭染色 ,用凝胶成像仪拍照。

1.2.4 数据分析

对于凝胶成像系统记录 RAPD 图谱 ,根据 Marker 计算不同扩增片段的分子量大小 ,同一引物的扩增产物在琼脂糖凝胶电泳中迁移率相同的条带被认为是同源的 ,属于同一位点的条带 ,按清晰可见的强带或反复出现的弱带记为 1 ,无记为 0 ,形成二元数据。应用 Dps 软件计算 Shannon 信息指数 :

$$H = - \sum_{i=1}^k p_i \ln p_i$$

式中 k 为 RAPD 条带数 P_i 为第 i 条带在该种群出现的频率 H 为每条引物种群 RAPD 多样性指数。使用 NTSYS2.0 计算不同种群间的遗传相似系数 ,并根据其相似性系数进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取结果

本试验采用 CTAB 法 ,对无水乙醇浸泡标本进行了基因组 DNA 的提取。提取结果经 0.8 % 琼脂糖凝胶电泳检测显示 DNA 带型整齐 ,无拖带现象 ,说明 DNA 降解很少 ,较为完整 ;且 DNA 纯度和得率均较高。

2.2 扩增结果

从 22 种引物组合中筛选出 5 种 ,其引物名称及产生的标记见表 2。在 8 个种群中产生了 65 个片段 ,不同引物在不同种群中产生的片段数目不同 ,5 种引物在蛭虫不同地理种群之间和种间没有产生各自的特征带谱。因此 ,在种群之间和种间没有产生鉴别引物和标记 ,但 5 种引物所产生的 RAPD 图谱联合起来可产生个体间的特征图谱。

2.3 遗传多样性

Shannon 信息指数显示 :在同一物种中 ,不同种群由同一引物获得的遗传多样性 (H 值)呈现差异 (表 3) ,如皱大球蛭 (引物 S61 , H (HZ) = 0. 2849 , H (SZ) = 0. 3074 , H (BZ) = 0. 2219 , H (CZ) = 0. 4850) ,反映了引物对基因组 DNA 扩增片段的多态性 ,说明了不同种群基因组的差异。比较两个物种的平均遗传多样性 ,皱大球蛭的平均遗传多样性稍高 (0. 3456) ,瘤坚大球蛭的平均遗传多样性稍低 (0. 3225)。

2.4 遗传相似性分析

相似系数反映两个种群间的遗传一致性。根据记录结果 ,运用 NTSYS2.0 软件计算出不同地理种群间及种间的遗传相似系数 (表 4)。从表 4 中可以看出 ,皱大球蛭与瘤坚大球蛭的种内遗传相似性大于种间遗传相似性 ,如邯郸和石家庄两地的皱大球蛭的遗传相似系数为 0. 8727 ,两地的瘤坚大球蛭的遗传相似系数为 0. 9091 ,均大于皱大球蛭和瘤坚大球蛭种间的遗传相似性 (0. 6628 ~ 0. 6727)。瘤坚大球蛭种群的平均遗传相似程度为 0. 4564 ,高于皱大球蛭 (0. 4109) ,说明物种不同 ,变异程度也不同。同时在地理位置上随地理距离的增加遗传相似性变小 ,如皱大球蛭中邯郸与石家庄两个种群的遗传相似系数最大为 0. 8727 ,与保定种群的为 0. 6727 ,与承德种群的最小 0. 5637 ;瘤坚大球蛭中邯郸与石家庄两个种群的遗传相似系数最大为 0. 9091 ,与保定种群的为 0. 7636 ,与承德种群的最小为 0. 6364。

2.5 聚类分析

根据表 3 进行聚类分析 (图 2)。结果显示同一物种的不同种群首先相聚 ,而后是种间相聚。邯郸种群与石家庄种群的相似程度最高 ,先聚为一类 ;其次是保定种群与承德种群。瘤坚大球蛭中邯郸种群与石家庄种群几乎没有差异 ,在 0. 91 处处于水平状态 ,承德种群与保定种群、石家庄种群、邯郸种群的差异较大在 0. 75

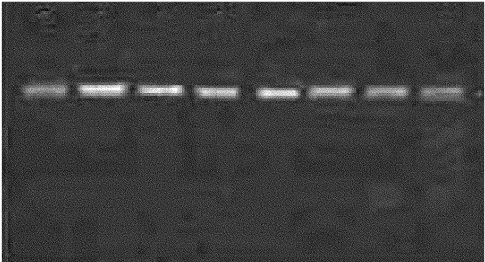


图 1 不同地理种群蛭虫 DNA 提取结果
Fig. 1 *Eulecanium giganteum* Shinji and *Eulecanium kuwanai* Kanda genomic DNA extraction

处与三者聚为一类。

表 2 不同种群 5 个引物的 RAPD 位点数和多态位点比率

Table 2 Proportion of polymorphic loci to total RAPD loci in each population detected with 5 primers				
种群 Population	样本数 Sample size	位点数 Total loci	多态位点数 Polymorphic loci	多态位点比率 Proportionof polymorphic loci (P)
HZ	12	45	35	0. 778
SZ	11	38	31	0. 816
BZ	12	41	32	0. 78
CZ	11	43	38	0. 884
HL	10	39	28	0. 718
SL	12	41	29	0. 707
BL	10	37	25	0. 676
CL	12	40	27	0. 675
总计 Total	90	103	68	0. 661

表 3 各种群各引物的 Shannon 信息指数

Table 3 Shannon's index detected with 5 primer 8 populations								
引物 Primer	皱大球蚧 <i>Eulecanium kuwanai</i> Kanda				瘤坚大球蚧 <i>Eulecanium gigantean</i> Shinji			
	HZ	SZ	BZ	CZ	HL	SL	BL	CL
S61	0. 2849	0. 3074	0. 2219	0. 4850	0. 3233	0. 2048	0. 3149	0. 3093
S64	0. 3219	0. 1368	0. 4073	0. 4219	0. 3073	0. 3259	0. 3084	0. 3273
S67	0. 3699	0. 3845	0. 4709	0. 3848	0. 3679	0. 3654	0. 3249	0. 4632
H9	0. . 4319	0. 3709	0. 4084	0. 4849	0. 4219	0. 1023	0. 3293	0. 3427
H16	0. 3073	0. 3849	0. 2219	0. 1045	0. 3219	0. 3349	0. 3496	0. 3049
平均 Mean	0. 3431	0. 3169	0. 3461	0. 3762	0. 3485	0. 2667	0. 3254	0. 3494
		0. 3456				0. 3225		

表 4 不同地理种群之间的遗传相似度

Table 4 Similarity matrix of different populations								
	HZ	SZ	BZ	CZ	HL	SL	BL	CL
HZ	1							
SZ	0. 8727	1						
BZ	0. 6727	0. 6909	1					
CZ	0. 5637	0. 6182	0. 6909	1				
HL	0. 6628	0. 6909	0. 7091	0. 5455	1			
SL	0. 6909	0. 6727	0. 7636	0. 6000	0. 9091	1		
BL	0. 5636	0. 5818	0. 6000	0. 5455	0. 7636	0. 7818	1	
CL	0. 6364	0. 5818	0. 6364	0. 4727	0. 6364	0. 7273	0. 7455	1

* 种群代码同表 1 See table for explanation of population code

3 讨论

3.1 RAPD 影响因素

RAPD 技术操作简单、快速、不依赖基因组遗传信息 ,但其稳定性和重复性受诸多因素的影响 ,其中 DNA 的质量对获得可靠的实验结果起着重要的作用^[1] ,若 DNA 出现降解 ,直接影响 PCR 扩增的稳定性和重复性。实验中 ,为获得高分子量 DNA ,作者在以往方法的基础上 ,对 CTAB 法进行了改进 ,所提 DNA 完整、纯度高。对无水乙醇保存的标本 ,首先用 TE 浸泡使乙醇逐渐被置换 ,也有利于细胞内 DNA 和蛋白质分子之间交联的解离 ,为 DNA 的提取创造条件 ,后用预冷的 CTAB 进行提取即可获得高分子量的 DNA。为减少扩增过程中

Mg2+ ,TagDNA 聚合酶等对结果的影响 ,实验前 ,首先确定各引物最优扩增体系 ,在随后的检测中获得稳定结果。

3.2 蚧虫种群的遗传变异

蚧虫一生大部分虫态和虫期都是营固定寄生 ,只有低龄若虫阶段能爬行 ,雌成虫阶段不能移动 ,因此蚧虫远距离扩散和传播常是被动地人为传带和风吹、雨水冲刷等^[12]。应用 RAPD 技术检测了河北省邯郸、石家庄、保定、承德 4 个地区的皱大球蚧和瘤坚大球蚧不同地理种群之间的 DNA 多态性 ,从分子水平对供试的 8 个地理种群遗传变异进行了研究 ,研究表明河北省的皱大球蚧和瘤坚大球蚧不同地理种群之间已经产生了一定程度的遗传分化 ,这可能与蚧虫的生态习性、地理位置和生态环境有密切关系。在地理位置上由南到北随地理距离的增加、生态环境的变化 ,差异变得越来越大。邯郸与石家庄的地理距离较近 ,生态条件相似 ,故遗传相似性最高 ,说明两地的蚧虫基因交流比较广泛 ;有时地理的隔离的涵义仅限于距离的间隔 ,相距较远的两个地区的蚧虫不能相互交配 ,各自都要经受以当地环境为主体的自然选择。而两地的环境条件相差很远 ,不过 ,两地的条件差异并不是突然发生的 ,而是逐渐变化的 ,因此就产生了一个渐变群。在相邻群体间的基因流动使差异变得不太明显^[13] ,保定种群就处在这样一个位置上。从地理位置上看 ,承德和邯郸在地理距离上存在较大的跨度 ,基因交流较少 ,从生态环境上也有较大差异 ,温度胁迫是种群适应性反应的进化动力 ,会导致物种分化甚至新物种形成^[14]。

3.3 种间关系

本文研究的皱大球蚧 *Eulecanium kuwanai* Kanda 和瘤坚大球蚧 *Eulecanium gigantean* Shinji 均属同翅目 Homoptera ,蚧科 Coccidae ,球坚蚧属 *Eulecanium* Cockeerell。二者生活史和习性类似 ,经常混合发生。遗传相似性分析和聚类分析发现种间的遗传差异明显大于同种内种群之间的遗传差异 ,反映出从 DNA 水平上揭示的遗传差异程度与表型水平上的差异程度基本一致。同时 Shannon 信息指数显示皱大球蚧的平均遗传多样性高于瘤坚大球蚧的平均遗传多样性 ,这可能与皱大球蚧主要寄生槐树而且寄主相对较多有关 ,城市绿化树种的传播、人为的携带和多样化的寄主 ,为更多地区基因交流提供了条件 ,促进了遗传差异的产生 ,导致遗传多样性的增加。

References :

[1] Simon J C ,Baumann S ,Sunnucks P ,et al. Reproductive mode and population genetic structure of the cereal aphid sitobion avenae studied using phenotype and microsatellite markers. Mo. Ecol ,1999 8 (4) 531 — 545.

[2] Sunnucks P ,Driver F , Brown W V ,Carver M ,Hales D F ,Milne W M. Genetic structure and aphid studied using microsatellites : cyclic parthenogenesis differentiated lineages and host specialization Bull. Eotomol. Res. ,1997 87 425 — 436.

[3] Tang B D. *Coccidae of China*. Taiyuan :Shanxi United Universities Press ,1991.

[4] Cui W ,Gao B J. The main scale insects of the economic trees and their control in north China. Beijing :China Forestry Publishing House ,1995.

[5] Cooley G ,Gullan P J ,Trueman H. E. A Preliminary phylogeny of the scale insects (Hemiptera :Sternorrhyncha :Coccoidea) based on nuclear small-subunit ribosomal DNA. Mol. Phylogen. Evol. 2002 25 43 — 52.

[6] Thao M L ,Gullan P J ,Baumann P. Secondary (γ -proteobacteria) Endosymbionts infect the primary (β -proteobacteria) endosymbionts of mealybugs multiple times and coevolve with their hosts. Appl Environ. Microbiol. 2002 68 (7) 3 190 — 197.

[7] Beuning L L ,Murphy P ,Wu E ,Batchelor T A ,Morris B A M J. Molecular-based approach to the differentiation of cassava mealybug species (Homoptera :Pseudococcidae). Econ. Entomol. 1999 92 (2) 463 — 472

[8] Campbel B C ,Steffen Campbell J D ,Gill R J. Evolutionary origin of whiteflies (Hemiptera :Sternorrhyncha :Aleyrodidae) inferred from 18SrDNA

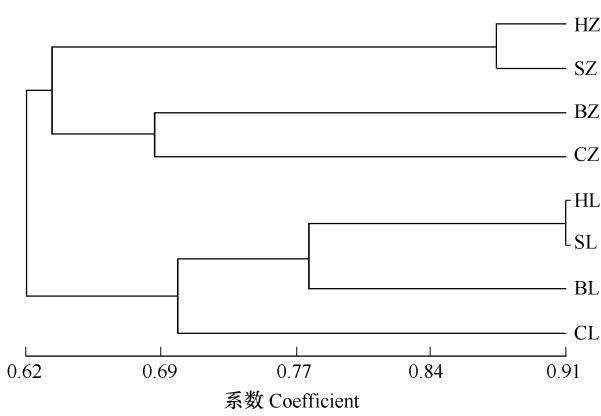


图2 对皱大球蚧和瘤坚大球蚧 8 个地理种群聚类分析
Fig.2 Dendrogram of cluster about 8 geographic population

sequences. Insect Molecul. Biol. ,1994 3 (2) 73 — 88.

[9] Boyce T M ,Zwick M E ,Aquado C F. Mitochondrial DNA in the pine weevil : size structure and heterophasmy . Genetics ,1989 ,123 825 — 836.

[10] Williams J G K ,Kubelik A R ,Livak K J , et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. ,1990 ,18 (22) 6531 — 6535.

[11] Black IV W C , Dutear N M , Puterka G J. Use of random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detet DNA polymorphisms in aphids. Bull. Ent Res ,1992 82 151 — 159.

[12] Xie Y P. The scale insects of the forest and fruit trees in Shanxi of China. Beijing : China Forestry Publishing House ,1998.

[13] Li J Q. Li J W. Cui G F. Conservation Biology. Beijing : China Forestry Publishing House 2002.

[14] Cheng B. Kang L. The adaptation of the insect coercing to the environment and the splitting of population. Natural Science Progress ,2005 ,15 (3) : 265 — 271.

参考文献：

[3] 汤祯德. 中国蚧科. 太原 :山西高校联合出版社 ,1991.

[4] 崔巍 ,高宝嘉. 华北经济树种主要蚧虫及其防治. 中国林业出版社 ,1995.

[12] 谢映平. 山西林果蚧虫. 北京 :中国林业出版社 ,1998.

[13] 李俊清 ,李景文 ,崔国法 ,等. 保护生物学. 中国林业出版社 2002.

[14] 陈兵 ,康乐. 昆虫对环境温度威胁的适应与种群分化. 自然科学进展 2005 ,15 (3) 265 ~ 271.