

DOI: 10.5846/stxb201306131697

刘军侠, 刘全超, 姜文虎, 宋晓英, 高宝嘉. 草履蚧不同寄主和地理种群遗传分化的 RAPD 分析. 生态学报, 2016, 36(2): - .

Liu J X, Liu Q C, Jiang W H, Song X Y, Gao B J. RAPD Analysis of Genetic Differentiation in the Different Hosts and Geographic Populations of *Drosicha corpulenta*. Acta Ecologica Sinica, 2016, 36(2): - .

草履蚧不同寄主和地理种群遗传分化的 RAPD 分析

刘军侠^{1,2}, 刘全超¹, 姜文虎¹, 宋晓英¹, 高宝嘉^{1,2,*}

1 河北农业大学林学院* 保定 071000

2 河北省林木种质资源与森林保护重点实验室* 保定 071000

摘要:本研究应用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术对草履蚧保定、石家庄、邯郸 16 个不同寄主地理种群遗传多样性和种群分化进行研究, 结果显示 4 个 RAPD 引物共扩增出 41 个多态性位点, 多态位点比率为 100%。遗传距离指数在 0.701—0.4360, 平均为 0.2395。其中以邯郸枫杨和邯郸垂丝海棠为寄主的草履蚧种群遗传距离最小(0.0701); 以石家庄紫叶李和邯郸木槿为寄主的种群遗传距离最大(0.4360)。遗传一致度系数在 0.6466—0.9290。说明草履蚧不同种群遗传多样性丰富并存在遗传差异。聚类分析结果表明草履蚧种群遗传多样性同时受到寄主和地理因素的双重影响, 且不同寄主草履蚧种群已产生明显的遗传分化。

关键词: 草履蚧; 寄主植物; 种群分化; RAPD

RAPD Analysis of Genetic Differentiation in the Different Hosts and Geographic Populations of *Drosicha corpulenta*

LIU Junxia^{1,2}, LIU Quanchao¹, JIANG Wenhui¹, SONG Xiaoyin¹, GAO Baojia^{1,2,*}

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

2 Key Laboratory of Germplasm Resources of Forest Trees and Forest Protection College of Forest of Hebei, Baoding 071000, China

Abstract: The genetic diversity and population differentiation among geographic populations of 16 different *Drosicha corpulenta* host collected from Baoding, Shijiazhuang, and Handan in Hebei were analyzed by RAPD. The results showed that four RAPD primers were amplified out of 41 polymorphism loci, and that the percent of polymorphic loci was 100%. The genetic distance index of the populations ranged from 0.0701 to 0.4360 and the average value was 0.2395. The genetic distance index for *D. corpulenta* populations on *Pterocarya stenoptera* and *Malus halliana* (Voss.) Koehne in Handan was the smallest (0.0701). The genetic distance index for *D. corpulenta* populations on *Prunus cerasifera* in Shijiazhuang and *Hibiscus syriacus* in Handan was the largest of all, and the similarity coefficients ranged from 0.6466 to 0.9290. The genetic diversity of the different *D. corpulenta* populations was classified as abundant, and genetic differences were found. According to the results of cluster analysis, the genetic diversity of *D. corpulenta* populations was affected by both host and geographic location, and the different host populations of *D. corpulenta* showed obvious genetic differentiation.

Key Words: *Drosicha corpulenta*; host plant; population differentiation; RAPD

随着分子生物学发展, 应用分子系统分析的方法研究昆虫种群分化和遗传多样性, 从分子水平探讨寄主、

基金项目: 河北省自然科学基金 (C2009000592)

收稿日期: 2013-06-13; 网络出版日期: 2015- -

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

环境因子等对昆虫适应进化的影响,以明确昆虫适应进化的分子机制。蚱虫作为一类营相对固定生活的刺吸类害虫,呈聚集型空间分布,扩散能力弱,其发生与寄主种群以及地理环境有着密切的关系^[1-4],在长期的系统发育中形成了相对稳定的区系组成以适应不同环境,不同的寄主种群、生态地理种群间差异明显。高宝嘉等对皱大球蚱 (*Eulecanium kuwana i*) 和瘤坚大球蚱 (*E. gigan tean*) 地理种群的 RAPD 遗传分化的研究发现,已发生种内遗传变异,但尚未达到亚种水平^[5]。Burban 等通过对松干蚱的研究指出松干蚱种群变异与寄主植物的遗传结构有关^[6]。本研究选取河北省不同草履蚱 *Drosicha corpulenta*(kawana) 种群,对其遗传分化进行 RAPD 分析,揭示寄主植物、地理环境等生态条件对蚱虫遗传分化的影响,为深入探讨植物昆虫协同进化关系和昆虫适应潜力提供依据。

1 材料和方法

1.1 供试昆虫

2011 年 4—5 月于保定、石家庄、邯郸不同寄主上采集雌成虫(见表 1)。不同寄主相距 50 米以上,每种寄主东、南、西、北方向的上、中、下部枝条分别取样。将采集的蚱虫饥饿 24h 以上,使其消化道内的物质充分消化,以防外源 DNA 干扰实验结果;-20℃ 冰箱中保存。

表 1 供试草履蚱材料来源

Table 1 Sources of *D. corpulenta* materials for trial

种群代码 Population cord	寄主 Host plant	地点 Site	采样时间 Date	种群代码 Population cord	寄主 Host plant	地点 Site	采样时间 Date
BB	白蜡	保定	20110506	HS	华桑	邯郸	20110509
BBT	紫叶碧桃	保定	20110506	HZ	紫叶李	邯郸	20110509
BY	月季	保定	20110506	HF	枫杨	邯郸	20110509
BZ	紫叶李	保定	20110507	HL	梨树	邯郸	20110509
SB	紫叶碧桃	石家庄	20110507	HM	木槿	邯郸	20110509
SZ	紫叶李	石家庄	20110508	HC	垂丝海棠	邯郸	20110509
SX	悬铃木	石家庄	20110508	HW	紫薇	邯郸	20110509
SC	稠李	石家庄	20110508	HB	紫叶碧桃	邯郸	20110509

白蜡 *Fraxinus chinensis* 紫叶碧桃 *Prunus persica f. atropurpurea* 月季 *Rosa chinensis* 紫叶李 *Prunus cerasifera cv. Pissardii* 悬铃木 *Platanus acerifolia* (Ait.) Willd 稠李 *Prunus padus* L. 梨树 *Pyrus sorotina* 枫杨 *Pterocarya stenoptera* C. DC 木槿 *Hibiscus syriacus* 垂丝海棠 *Malus halliana* Koehne 紫薇 *Lagerstroemia indica* 华桑 *Morus cathayana*

1.2 主要试剂与仪器

本实验所用的 TaqDNA 聚合酶、dNTP、蛋白酶 K、RAPD 引物、DNA 标记(DL2000)均由上海生物工程有限公司生产。

1.3 研究方法

1.3.1 提取 DNA

参照 Boyce 等的方法^[7],并做适当修改。取一只蚱虫于灭菌的研钵(每个种群取 28 个样本),加入液氮迅速研磨成粉末,放入 1.5ml 的离心管中,加入 700μl 预冷的 2×CTAB(0.1mol/L Tris2-HCl, 1.4mol/L NaCl, 0.2 mol/L EDTA, 0.2%β 巯基乙醇, 0.05mol/L CT AB, pH8.3),加入蛋白酶 K 至终浓度为 100μg/ml, 65℃ 下水浴 1 小时,用 12000r/min 离心 5min,取上清液,加入等体积得酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)轻轻混匀,反复抽提两次。再经等体积的异丙醇沉淀 1h, 4℃ 下 10000r/min 离心 10min,去上清,70%的乙醇清洗 1-2 次,干燥后加入适量 TE 溶液溶解 DNA,加入 RNaseA 至终浓度为 2μg/L 后, 37℃ 下水浴 1h, -20℃ 保存待用。

1.3.2 RAPD 扩增及产物检测

经预试验筛选出 4 条可用引物,其引物名称及序列见表 2。参照 Williams 的方法^[8],反应体系 25μl,其中

模板 50ng, 10×Buffer 2.5μl, Mg²⁺ 114—210 mmol/L (因座位而异), dNTP 200μmol/L, 引物 (0.8μmol/L), Taq 酶 1.5U 反应条件: 94℃ 预变性 1min; 92℃ 变性 1 min, 37℃ 退火 1 min (因座位而异), 72℃ 延伸 2 min, 45 个循环; 72℃ 再延伸 10min; 4℃ 终止反应。

扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶 (含 1% 核酸显色剂) 分离, 电泳缓冲液为 0.5×TBE, 上样量为 10ul。电泳结束后, 用凝胶成像仪拍照。

1.3.3 数据分析

RAPD 为显性标记, 同一引物的扩增产物在琼脂糖凝胶电泳中迁移律相同的条带被认为是同源性的, 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, 无带记为 0, 形成二元数据。应用 Popstream32 和 NTSYSpc2.1 软件, 计算种群遗传多样性参数并根据遗传相似系数进行 UPGMA 种群聚类分析。

2 结果与分析

2.1 遗传多态位点分析

引物扩增结果见图 1—4, 不同种群遗传多样性统计见表 3。供试引物对 16 个种群 448 个个体进行扩增, 共产生 41 条清晰、稳定的片段, 平均每条引物扩增 10.25 条片段, 各片段分子量大小在 200—2000bp 之间, 种群内和种群间并未产生各自特征性带谱。实验共检测出 41 个多态位点, 多态位点比率为 100%, 说明草履蚥种群遗传多样性丰富。但不同种群的扩增产物多态性结果不同, 各种群多态位点比率在 31.71%—63.41% 之间, 其中邯郸紫薇寄主种群多态位点比率最低 (31.71%), 邯郸紫叶李寄主种群 (63.41%) 和邯郸桑树寄主种群 (60.98%) 多态位点最高, 遗传多样性较其它种群丰富。

2.2 遗传多样性分析

Nei 指数估计的不同种群间遗传距离和遗传一致度结果见表 4。由表 4 可知, 16 个种群 Shannon 信息指数的变化范围在 0.1708—0.2967 之间, 平均值为 0.2306。邯郸桑树种群的 Shannon 信息指数最高, 邯郸紫薇种群最低。16 个种群 Nei's 基因多样性指数变化范围在 0.1101—0.1991 之间, 平均值为 0.1511。邯郸桑树种群的基因多样性最高, 保定紫叶碧桃种群最低, 这与 Shannon 信息指数估计的遗传多样性稍有差异。说明同一物种不同种群遗传多样性存在差异。

2.3 遗传相似度与遗传距离分析

由表 4 可知, 16 个草履蚥种群的遗传相似度在 0.6466—0.9290 之间, 平均值为 0.7873; 遗传距离在 0.0701—0.4360 之间, 平均值为 0.2395, 说明不同种群间遗传差异较大。其中以邯郸枫杨和以邯郸垂丝海棠为寄主的草履蚥种群最相似, 遗传距离最小 (0.0701); 以石家庄紫叶李和以邯郸木槿为寄主的种群遗传距离最大 (0.4360), 说明二者的遗传差异最大。

紫叶李邯郸种群与石家庄种群遗传距离为 0.3330, 与保定种群遗传距离为 0.3426; 紫叶碧桃邯郸种群与石家庄种群遗传距离为 0.3170, 与保定种群遗传距离为 0.3816; 即同种寄主不同地理种群随地理距离的增加遗传距离增加。

表 2 随机引物编号及序列

Table 2 RAPD primer codes and their sequences

引物编号 Primer NO.	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')
H9	TGTAGCTGGG
H16	TCTCAGCTGG
S64	CCGCATCTAC
S67	GTCCCGACGA

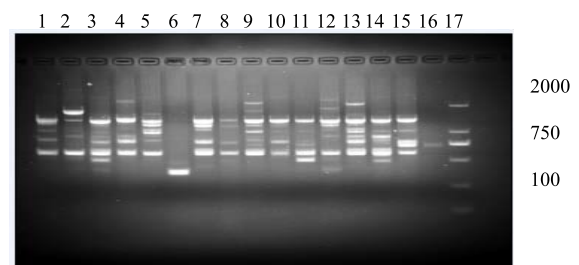


图 1 引物 H9 对 16 个草履蚥种群的 RAPD-PCR 结果

Fig. 1 RAPD-PCR results of primer H9 for 16 populations of *D. corpulenta*

1—4: HL、HF、HZ、HS; 5—8: HB、HW、HC、HM; 9—12: SC、SX、SZ、SB; 13—16: BY、BB、BZ、BBT; 17: DL2000

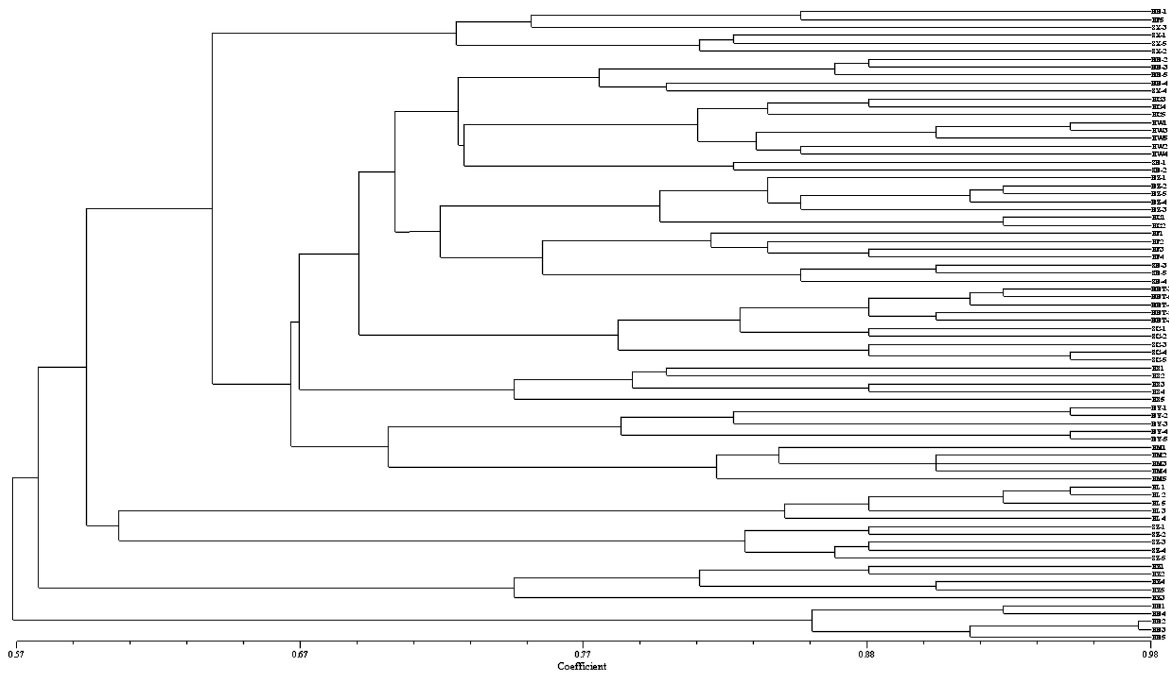


图 2 16 个草履蚧种群聚类分析图

Fig. 2 The UPGMA dendrogram cluster of 16 *Drosicha corpul* populations

种群代号同表 1 (See table 1 for explanation of population code)。为了方便比较查看,本图中每个种群采用 5 个样本的聚类分析。其聚类分析趋势与全部个体聚类图相一致,具有代表性。

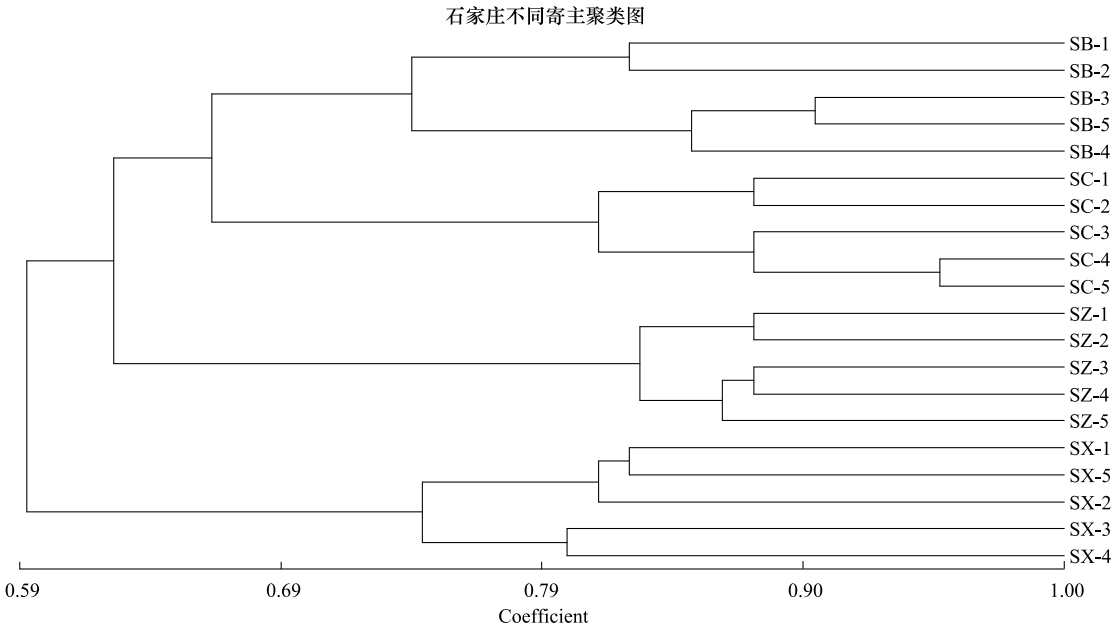


图 3 石家庄草履蚧种群聚类分析图

Fig. 3 The UPGMA dendrogram cluster of *Drosicha corpul* populations of Shijiazhuang

2.4 种群遗传相似度聚类分析

用 NTSYSpc2.1 对草履蚧种群的遗传相似系数进行 UPGMA 聚类分析,进一步分析种群间遗传关系(图 2)。结果显示:同一地理寄主种群绝大多数个体都能聚为一类,说明同一种群中个体间的遗传特性相似程度

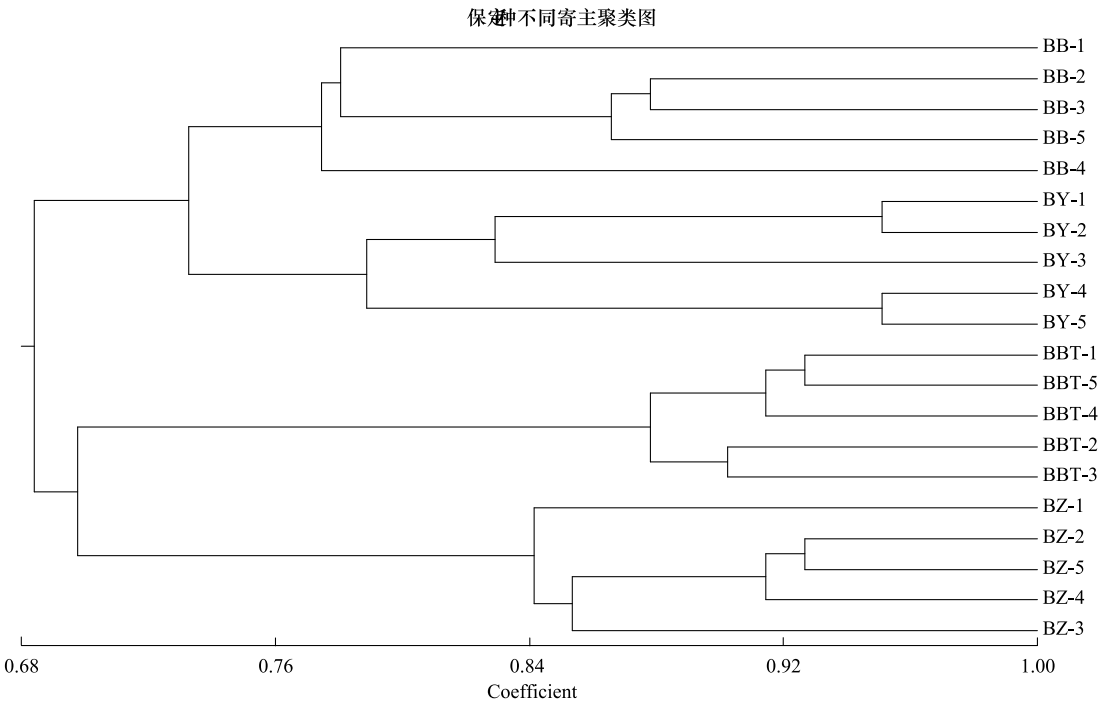


图 4 保定草履蚥种群聚类分析图

Fig. 4 The UPGMA dendrogram cluster of *Drosicha corpul* populations of Baoding

表 3 不同种群遗传多样性统计

Table 3 Statistics on the genetic diversity of different populations

种群 Population	样本数 Sample size	总位点数 Total loci	多态位点数 Polymorphic loci	多态位点比率 Proportion of polymorphic loci (P)	Nei's 多样性指数 Nei's gene diversity index (H)	Shannon 信息指数 Shannon's information index (I)
BB	28	41	22	53.66%	0.1374	0.2149
BBT	28	41	16	39.02%	0.1101	0.1724
BY	28	41	22	53.66%	0.1638	0.2503
BZ	28	41	21	51.22%	0.1740	0.2619
SB	28	41	21	51.22%	0.1596	0.2449
SZ	28	41	19	46.34%	0.1244	0.1952
SX	28	41	22	53.66%	0.1687	0.2543
SC	28	41	19	46.34%	0.1419	0.2145
HS	28	41	25	60.98%	0.1991	0.2967
HZ	28	41	26	63.41%	0.1705	0.2677
HF	28	41	21	51.22%	0.1747	0.2608
HL	28	41	16	39.02%	0.1421	0.2112
HM	28	41	20	48.78%	0.1223	0.1938
HC	28	41	20	48.78%	0.1708	0.2538
HW	28	41	13	31.71%	0.1167	0.1708
HB	28	41	23	56.10%	0.1417	0.2260
总数 Total	448	41	41	100.00%	0.1511	0.2306

种群代号同表 1 (See table 1 for explanation of population code)

高,遗传稳定性;草履蚥相同寄主种群首先聚类,遗传相似系数在 0.67 水平,说明寄主因素对草履蚥的种群分化产生明显的影响;保定、石家庄、邯郸的紫叶碧桃种群各自聚类,且遗传距离较远;同样以上三地的紫叶李种群也各自聚类,说明地理因素对种群的分化产生影响;草履蚥不同寄主的三大地理种群并未产生明显地理聚

表 4 Nei 指数估计的不同种群间遗传距离和遗传一致度
Table 4 Nei's original measures of genetic identity and genetic distance among different populations

种群 Pop	BB	BBT	BY	BZ	SB	SZ	SX	SC	HS	HZ	HF	HL	HM	HC	HW	HB
BB	****	0.8284	0.9195	0.8917	0.9118	0.7431	0.8739	0.8665	0.8825	0.7944	0.8925	0.7568	0.8284	0.9034	0.8740	0.7664
BBT	0.1883	****	0.8241	0.8536	0.7906	0.6818	0.8138	0.9042	0.7863	0.7272	0.7752	0.6543	0.7857	0.8144	0.7713	0.6828
BY	0.0840	0.1935	****	0.8304	0.9290	0.6903	0.8281	0.8795	0.8515	0.7450	0.8759	0.7757	0.9034	0.8830	0.8286	0.7651
BZ	0.1146	0.1583	0.1859	****	0.8207	0.7369	0.7651	0.8947	0.8548	0.7846	0.8322	0.7431	0.7728	0.8822	0.8217	0.7194
SB	0.0923	0.2350	0.0736	0.1976	****	0.7547	0.8242	0.8521	0.8104	0.7344	0.8704	0.7778	0.8297	0.8571	0.8476	0.7283
SZ	0.2970	0.3830	0.3706	0.3053	0.2814	****	0.6844	0.7013	0.6808	0.7168	0.7345	0.6799	0.6466	0.7436	0.7241	0.6486
SX	0.1348	0.2061	0.1886	0.2677	0.1933	0.3792	****	0.7457	0.7766	0.7814	0.8342	0.6817	0.7707	0.7909	0.7780	0.6818
SC	0.1433	0.1007	0.1284	0.1112	0.1600	0.3548	0.2935	****	0.8154	0.6978	0.8526	0.6633	0.8202	0.8846	0.8378	0.6670
HS	0.1250	0.2404	0.1608	0.1569	0.2102	0.3844	0.2528	0.2041	****	0.7946	0.8339	0.8011	0.8385	0.8586	0.7782	0.7769
HZ	0.2302	0.3185	0.2944	0.3426	0.3087	0.3330	0.2466	0.3599	0.2300	****	0.8305	0.7706	0.6799	0.7899	0.7864	0.7527
HF	0.1138	0.2546	0.1325	0.1837	0.1387	0.3085	0.1813	0.1595	0.1816	0.1858	****	0.7116	0.8180	0.9323	0.8624	0.7309
HL	0.2787	0.4241	0.2540	0.2969	0.2513	0.3858	0.3832	0.4105	0.2218	0.2605	0.3402	****	0.7131	0.7192	0.7050	0.7210
HM	0.1883	0.2411	0.1016	0.2577	0.1866	0.4360	0.2605	0.1982	0.1761	0.3859	0.2009	0.3381	****	0.8145	0.7720	0.7098
HC	0.1016	0.2052	0.1245	0.1253	0.1542	0.2962	0.2346	0.1226	0.1524	0.2358	0.0701	0.3296	0.2052	****	0.8608	0.7756
HW	0.1347	0.2597	0.1880	0.1964	0.1654	0.3228	0.2511	0.1770	0.2508	0.2403	0.1481	0.3496	0.2587	0.1499	****	0.7452
HB	0.2660	0.3816	0.2677	0.3294	0.3170	0.4330	0.3830	0.4049	0.2524	0.2841	0.3135	0.3271	0.3428	0.2541	0.2941	****

种群代号同表 1 (See table 1 for explanation of population code), 对角线以上为遗传相似度, 对角线以下为遗传距离, 对角线以上为遗传一致度, 对角线以下为遗传距离 (below diagonal)

类,说明相对于地理因素,寄主因素对草履蚱种群分化的影响更加明显。同一地区不同寄主种群聚类见图 3、图 4、图 5,可见同一地区同一寄主的个体聚为一类,而同一地区不同寄主间聚类规律不明显。

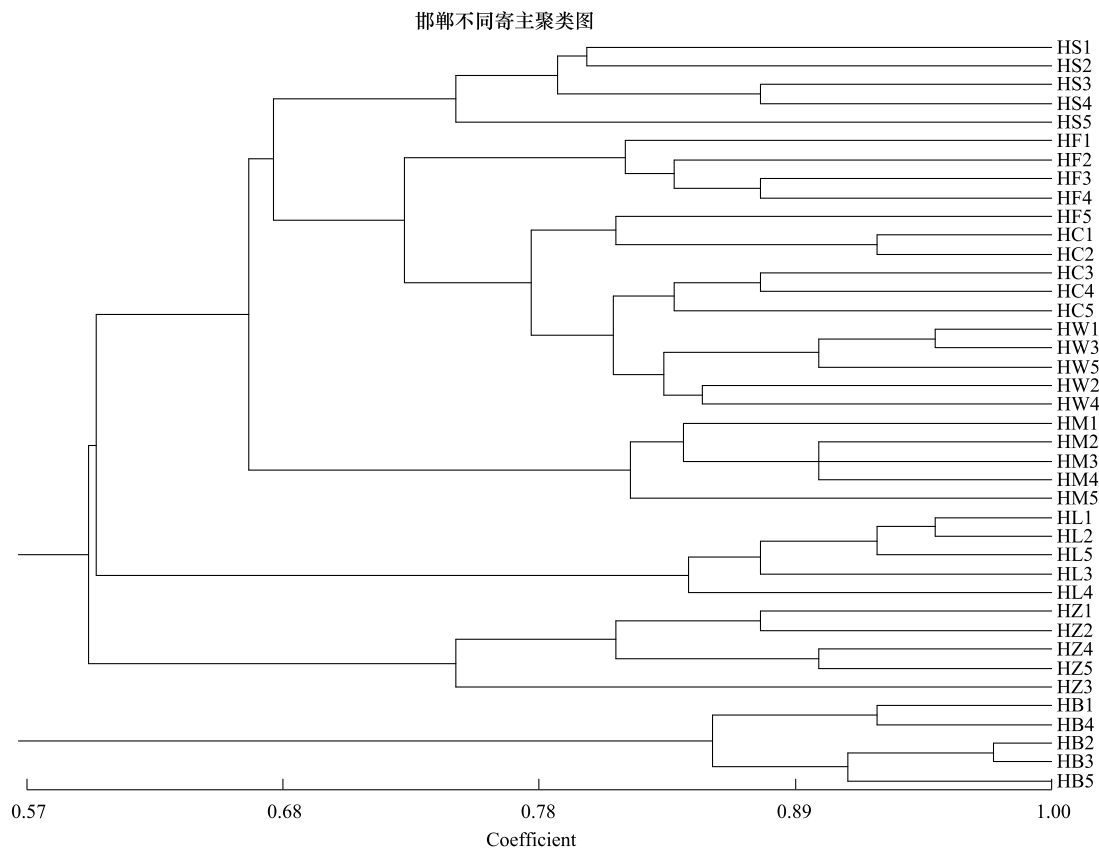


图 5 邯郸草履蚱种群聚类分析图

Fig. 5 The UPGMA dendrogram cluster of *Drosicha corpul* populations of Handan

3 结论与讨论

本文通过以上对草履蚱不同寄主和地理种群遗传分化的 RAPD 分析,表明: Shannon 信息指数和 Nei's 基因多样性指数显示草履蚱不同地理种群以及不同寄主种群遗传多样性丰富程度不同,草履蚱不同寄主种群之间存在不同程度的遗传差异,并已产生种群分化。草履蚱相同寄主不同地理种群之间存在遗传差异,地理因素对草履蚱种群分化产生影响。聚类分析结果显示,草履蚱种群分化同时受到寄主因素和地理因素的双重影响,相对于地理因素,寄主对草履蚱种群分化的影响更加明显。

草履蚱寄主植物广泛,主动扩散距离有限,因此其发生与寄主植物关系十分密切。本研究表明草履蚱不同寄主种群之间已经产生了明显的种群分化,这与草履蚱寄主生态条件、环境胁迫有密切关系。寄主植物自身的物理、化学等因素可影响植食性昆虫的生物学习性和遗传特性,促进昆虫种群分化,而昆虫对寄主植物具有选择性,对于不同寄主植物喜好程度也不尽相同^[9-10]。昆虫学家认为植食性昆虫可因嗜食的寄主不同而造成遗传隔离,由此形成不同的物种。Takada、Blackman、Weber 等研究表明烟蚜在不同寄主植物上存在着种群分化^[11-13]。本实验中寄主植物分类科属不尽相同,其生物学特性和化学成分各异,我们推测寄主植物种类不同是造成草履蚱种群分化的重要原因。

此外,大气污染以及昆虫群落结构^[14-15]等环境胁迫均能影响寄主植物与昆虫的关系,本实验寄主植物除受到草履蚱危害外,同时受到其他不同种昆虫取食。不同寄主植物上昆虫的种类、数量以及植物所处环境的不同可能都对草履蚱种群分化起作用,下一步有待从多因素分析探讨草履蚱种群分化原因。

参考文献 (References):

- [1] 梁隐泉, 高宝嘉, 甄志先, 王江柱, 刘志群, 牛建忠. 枣园昆虫群落及其与日本龟蜡蚧发生的关系. 应用生态学, 2006, 17(3): 472-476.
- [2] 薛皎亮, 谢映平, 范三红, 李艳芳. 城市污染促进瘤坚大球蚧种群增长的营养学研究. 林业科学. 2004, 40(1): 111-116.
- [3] 崔巍, 高宝嘉. 华北经济树种主要蚧虫及其防治. 北京: 林业出版社, 1995.
- [4] Beuning L L, Murphy P, Wu E, Batchelor T A, Morris B A M. Molecular-based approach to the differentiation of mealybug (Hemiptera: Pseudococcidae) species. Journal of Economic Entomology, 1999, 92(2): 463-472.
- [5] 高宝嘉, 李梦, 王春和, 高立杰. 皱大球蚧 (*Eulecanium kuwanai*) 和瘤坚大球蚧 (*Eulecanium gigantean*) 地理种群的 RAPD 遗传分化. 生态学报, 2007, 27(3): 918-923.
- [6] Burban C, Petit R J, Carcreff E, Jactel H. Rangewide variation of the maritime pine bast scale *Matsucoccus feytaudi* Duc. (Homoptera: Matsucoccidae) in relation to the genetic structure of its host. Molecular Ecology, 1999, 10(8): 1593-1602.
- [7] Boyce T M, Zwick M E, Aquado C F. Mitochondrial DNA in the bark weevils: size, structure and heteroplasmy. Genetics, 1989, 123(4): 825-836.
- [8] Williams J G, Kubelik A R, Livak K J, Rafalski J A, Tingley S V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, 1990, 18(22): 6531-6535.
- [9] Kelley S T, Farrell B D, Mitton J B. Effects of specialization on genetic differentiation in sister species of bark beetles. Heredity, 2000, 84(2): 218-227.
- [10] Shivayogeshwara B, Mallikharjunaiah H, Krishnaprasad N K, Shetty M V N. Integrated management of *spodoptera litura* Fabricius (*Noctuidae*: *Lepidoptera*) in FCV tobacco crop. Tobacco Research, 1991, 17(2): 59-61.
- [11] Takada H. Differences in adaptation to tobacco between host forms of *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae). Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology, 1988, 32(2): 115-119.
- [12] Blackman R L. Morphological discrimination of a tobacco-feeding form from *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) and a key to new world *Myzus* (*nectarosiphon*) species. Bulletin of Entomological Research, 1987, 77: 713-730.
- [13] Weber G. Genetic variability in host plant adaptation of the green peach aphid, *Myzus persicae*. Entomologia Experimentalis et Applicata, 1985, 38(1): 49-56.
- [14] Nelson B W, John M. Lead residues in Eastern Tent caterpillars (*Malacosoma americanum*) and their host plant (*Prunus serotina*) close to a major highway. Environment Entomology, 1980, 9(1): 10-12.
- [15] Alstad D N, Edmunds G F Jr, Weinstein L H. Effects of air pollutants on insect populations. Annual Review of Entomology, 1982, 27: 369-384.