

不同地理种群和红色及绿色麦 长管蚜遗传多样性分析*

张 焯 尹 姣 曹雅忠 李克斌**

(中国农业科学院植物保护研究所 植物病虫害生物学国家重点实验室 北京 100193)

摘 要 麦长管蚜 *Sitobion avenae* (Fabricius) 体色变异(红色和绿色)是一种常见的生物学现象,揭示其体色的转换机制对该类害虫的防控和测报具有潜在意义。本文利用微卫星标记技术,对麦长管蚜种群进行聚类分析和分子方差分析,从群体遗传学角度研究了不同地理种群和不同色型之间遗传多样性差异。研究表明,麦长管蚜的遗传分化主要以种群内的变异为主,种群间的变异占总变异的比例很小。此外,研究发现,红、绿色体间的遗传分化并不显著,且存在频繁的基因交流。这说明不同区域的不同体色麦长管蚜种群各自之间具有相似的遗传背景。

关键词 麦长管蚜, 地理种群, 体色, 微卫星标记

Genetic diversity of different geographic populations and body color types of *Sitobion avenae*

ZHANG Ye YIN Jiao CAO Ya-Zhong LI Ke-Bin**

(State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection,
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)

Abstract Variation in body color is a common phenomenon in *Sitobion avenae* (Fabricius) and understanding this variation has potential application in pest control and monitoring. Cluster analysis and molecular variance analysis of *S. avenae* were carried out using microsatellite markers and the genetic diversity of different geographic populations and color types analyzed from a population genetics perspective. The results show that *S. avenae*'s genetic differentiation is mainly due to variation within populations, with variation among populations comprising a relatively small proportion of the total variance. In addition, we found no significant genetic differentiation between different colors morphs and that gene exchange in *S. avenae* is frequent.

Key words *Sitobion avenae*, geographic populations, body color, microsatellite markers

麦长管蚜 *Sitobion avenae* (Fabricius) 是我国各小麦产区常发性危害严重的害虫之一,而且是麦类病毒病的传播媒介,是小麦穗期(受害最敏感期)的优势麦蚜种群,对小麦产量和质量造成严重的影响(曹雅忠和李世功,1990;杨素钦和杨逸兰,1991)。小麦蚜虫自20世纪70年代以来,其危害状况由间歇性发生加剧为常发性发生和不断上升趋势;到90年代中后期,从发生面积、防治后的实际损失方面来看,小麦蚜虫已上升为我国农作物

重大病虫害中仅次于稻飞虱、水稻纹枯病的第3位(陈生斗和胡伯海,2003)。进入21世纪后,麦蚜在各麦区仍呈中等偏重发生态势,发生面积一直居高不下。据不完全统计,全国麦蚜年发生面积持续保持在1000万公顷次以上(曹雅忠等,2006)。

与其他昆虫相比,蚜虫具有一些独特的生殖特征和遗传构造,这也促使其多型现象的产生(薛增召和袁峰,1992)。在大多数自然环境下,蚜虫

* 资助项目:公益性行业(农业)科研专项(201103022,200803002)。

** 通讯作者, E-mail: kbli@ippcaas.cn

收稿日期:2011-09-20,接受日期:2011-11-02

的体色相对固定,并以一种体色为主导,但有些蚜虫存在明显的体色分化现象。例如,桃蚜 *Myzus persicae* (Sulzer)除了常见的红色和绿色外,还有黄绿色、黄白色、褐色等体色(程新胜等,1998);棉蚜 *Aphis gossypii* (Glover)自然种群分为黄色型和绿色型2种个体(原国辉,2002)。麦长管蚜有绿、淡绿、橙色之分(张利军等,2003)等。为了解释昆虫的体色变化机理,一些理论和假说也相继提出,这包括寄主专化论、环境因素控制论以及基因控制论(程茂高,2005)。赵惠燕(1993)根据棉蚜体色的变化过程,构建了其生态遗传模式。

本实验利用微卫星标记技术,将不同年份、不同区域、不同体色三因素综合考虑,对我国部分麦区的麦长管蚜种群进行了遗传多样性分析,特别着重对红、绿体色的差异进行比较,其研究结果不仅对于研究麦蚜的迁飞扩散、预测预报或麦蚜的成灾机理提供分子遗传学证据,而且对于解析麦长管蚜体色变化的适应机制以及遗传控制也具有重要参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究中的所有样本均采自于冬小麦,包括2年的样本(2008和2009)和2种体色(红色和绿色)生物型。采样地点包括北京、杭州、武汉和甘肃省的甘谷。各采样点内都是随机采集,样点与样点的间隔20 m以上以避免采到同一头孤雌蚜所产的后代,使样本具有最大的代表性。遗传检测中每个体色群体和地理群体的个体数是30头。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 基因组 DNA 的提取参照 Sunnucks 等(1996)的方法稍加改进。主要步骤:①将单头蚜虫经液氮处理后研磨成粉末状,并迅速加入 300 μ L TENS 缓冲液(TENS:50 mmol/L Tris-Cl, pH 7.5, 400 mmol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 0.5% SDS), 37 $^{\circ}$ C 下保育 3~18 h; ②加入 85 μ L 5 mol/L NaCl, 旋涡混匀 15 s, 14 000 r/min 离心 5 min; ③取上清, 加入等体积的冰冷无水乙醇, 轻混匀; ④14 000 r/min 离心 5 min, 用 70% 乙醇洗 1 次; ⑤室温下干燥沉淀, 加入适量的 TE 将提取的 DNA 重新溶解; ⑥加入适量的 RNA 酶消化 DNA 溶解液, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 引物的选择与来源 采用 Sunnucks 等(1997)和 Simon 等(2001)筛选的麦长管蚜微卫星位点及已发表过的相关引物序列, 研究证实这些引物在麦长管蚜群体中扩增效率高且多态性丰富。由上海生工合成 5 对引物, 引物序列见表 1。

1.2.3 PCR 反应条件 PCR 反应体系总体积为 20 μ L, 反应混合液中 2 \times TaqMix (10 μ L), primer1 (10 pmol/L), primer2 (10 pmol/L), DNA Template (60~100 ng), 加 ddH₂O 至反应体积为 20 μ L, 矿物油 1~2 滴。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, T $^{\circ}$ C (因引物而异) 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 30 个循环, 最后于 72 $^{\circ}$ C 下延伸 5 min。

1.2.4 PCR 反应产物检测 将反应后的 PCR 产物用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳结合银染法显色进行检测, 记录电泳图谱数据, 并利用 POPGENE 软件和 MEGA 软件对数据进行统计与分析。

表 1 所选用的 5 个微卫星位点及相关引物序列

Table 1 The five SSR loci used in the present study and their primer sequences

SSR 位点 SSR locus	GenBank 登录号 GenBank accession No.	引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence	T _m 值 T _m value
S17b	AY349961	S17f	TCATTCGGTTCGACATTTT	53.70
		S17r	ATGCGTCGCTTAGTGAAC	57.56
S23	AY349963	S23f	GCTCCGAGAGCATTTCATTAGG	59.97
		S23r	CGTCGTTGTCATTGTCGTCG	59.85
S49	AY349970	S49f	CGCATTTAGGAGGTTTCGAC	57.80
		S49r	GTGTGTGTGCATGTGCAGTG	59.85
Sm10	AY380119	Sm10f	TCTGCTGCATTACTGTTGGC	57.80
		Sm10r	TCGTCTACTTCGCCGTCA	57.30
Sm12	AY380121	Sm12f	CACCATCGCGTTTCATCTTA	55.75
		Sm12r	ACTCCCAACCTCTGATGAGC	59.85

2 结果与分析

2.1 微卫星 PCR 及电泳检测的效果

用 2% 的琼脂糖凝胶对 SSR-PCR 扩增产物进行电泳检测, 结果发现麦长管蚜的 4 个地理种群在所选的 5 个微卫星位点均有很高的扩增效率, 扩增条带集中在 100 ~ 200 bp 之间, 且呈现一定的条带多态性。在保证 PCR 扩增成功的基础上进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。银染结果显示, 电泳凝胶的分辨率较高, 能够清楚区分每个等位基因片段的相对大小。虽然 S49 位点上的部分个体出现了非特异性条带, 但仍然可以分辨杂合和纯合状态。

2.2 等位变异数及多态性信息含量分析

分别对不同地理种群在 5 个微卫星位点的扩增片段进行判读, 根据其出现的不同带型数目得到该位点的等位变异数, 并统计不同带型在该位点所有样本中的重复次数, 计算出其多态性信息含量。

结果表明, 5 个位点的等位变异数各不相同, S17b 位点变异数最小, 仅为 14; 而 S49 位点则相对较高, 达到 36。5 个检测位点所出现的不同带型的数目从大到小依次为: S49 > Sm12 > S23 > Sm10 > S17b。多态信息含量指标上, 除 S49 位点达到 0.9363, 其余 4 个位点均处于多态性信息含量的平均水平, 但总体来说, 这 5 个位点能检测的个体间的遗传多态性都很丰富, 适合麦长管蚜的微卫星分析。各项指标的具体数值见表 2。

表 2 SSR 标记扩增结果

Table 2 Amplification of selected SSR markers

引物 Primer	退火温度 Temperature (°C)	等位变异数 Number of allele	多态性信息含量 (PIC) Polymorphic information content
S17b	53	14	0.8878
S23	59	21	0.8684
S49	57	36	0.9363
Sm10	57	20	0.8798
Sm12	55	30	0.8561
合计 Total		121	4.4284
平均 Average		24.2	0.8857

2.3 同一年份、不同地区、不同体色型麦长管蚜种群之间的遗传距离及聚类分析

用 POPGENE 软件分别计算出 2008 和 2009 年北京、武汉、杭州、甘谷 4 个地理种群之间的遗传距离及遗传相似度, 根据 Nei's 遗传距离将不同年份、不同地区的种群分别进行 UPGMA 聚类, 并

绘制成图。

图谱显示, 当对混合种群、红绿单一体色种群分别进行聚类分析时, 2 年的结果较为一致, 故不做赘述 (图 1 ~ 3)。此外, 红绿体色混合种群的聚类结果与单一绿体色种群分析结果一致, 不过, 当仅考虑红体色种群时, 其聚类结果和混合种群, 以

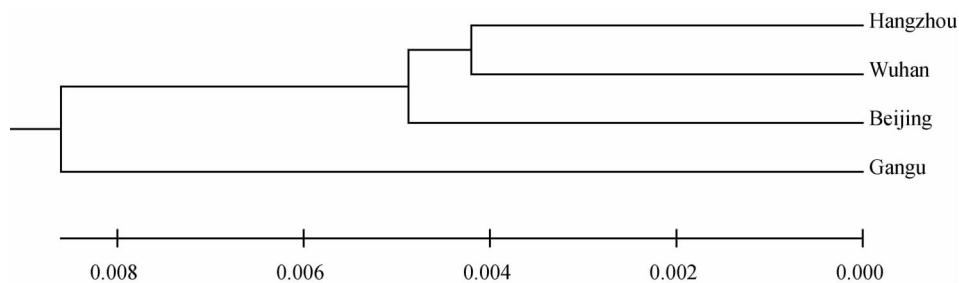


图 1 麦长管蚜 4 个地理种群的聚类图谱

Fig. 1 Clustering chart of four *Sitobion avenae* populations among Beijing, Gangu, Hangzhou and Wuhan

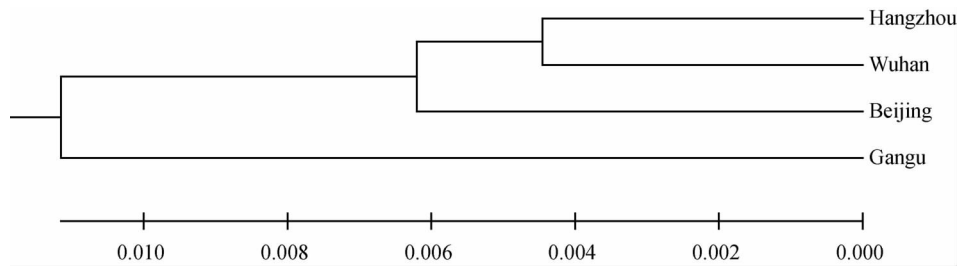


图 2 绿色麦长管蚜 4 个地区的聚类图谱

Fig. 2 Clustering chart of four *Sitobion avenae* populations (green body colour) among Beijing, Gangu, Hangzhou and Wuhan

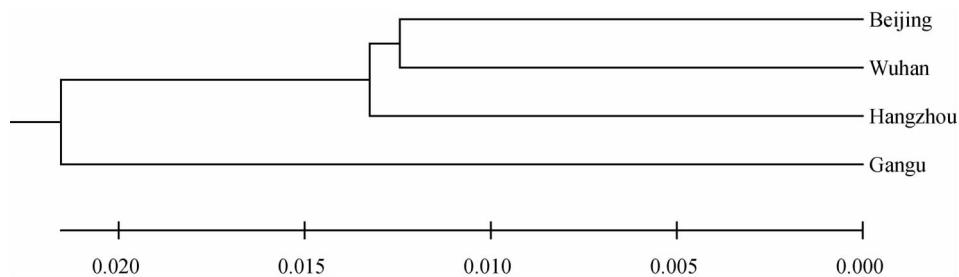


图 3 红色麦长管蚜 4 个地区的聚类图谱

Fig. 3 Clustering chart of four *Sitobion avenae* populations (red body colour) among Beijing, Gangu, Hangzhou and Wuhan

及绿色种群聚类结果并非完全相同。

2.4 分子方差分析

用 AMOVA 软件分别对混合种群、绿色种群和红色种群进行遗传变异巢式方差分析,计算出遗传分化指数 F_{st} 值和基因流 Nm (表 3)。

分子方差分析结果表明,不同地理种群麦长管蚜在种群内的变异为 87%,而在种群间的变异为 13%;不同体色型麦长管蚜在种群内的变异为

95%,而在种群间的变异仅为 5%;红体色麦长管蚜在种群内的变异为 80%,而在种群间的变异为 20%。3 个分类等级上的分子方差结果均显示,种群内的变异度要远远大于种群间的变异度。

此外,在混合种群和单一的红色型内,其不同地理种群间的分化指数分别为 0.130 和 0.200,基因流分别为 1.675 和 1.002。而不同体色间的分化指数则仅为 0.051,基因流则相对较高,为 4.697(表 3)。

表 3 麦长管蚜 AMOVA 分析结果

Table 3 The results of AMOVA for *Sitobion avenae*

	不同地理种群 Geographic population	不同体色种群 Body-color population	红色种群 Population of red biotype
遗传分化指数 F_{st}	0.130	0.051	0.200
基因流 Nm	1.675	4.697	1.002

3 讨论

3.1 微卫星标记及电泳检测的效果

由于变性胶中 PCR 产物是以单链形式存在

的,并且不受碱基组成的影响。因此,如果 SSR-PCR 产物的两条互补链分子质量相近,在变性胶中纯合子表现为单带,杂合子为双带。电泳结果发现,各位点均有杂合子和纯合子出现,且杂合子

所占的比例远远高于纯合子,具有较高的杂合度。这与王永模(2007)对我国麦长管蚜种群杂合度的研究结果相一致。

此外,电泳结果还显示各位点出现许多相同的基因型,虽然仅凭单位点上的基因型相同还不能确定它们属于同一个克隆,但 Sunnucks 等(1997)的研究表明,一般在 4~5 个位点上的基因型相同,便可以确定它们属于同一个克隆。这种各位点出现相同基因型的现象与麦长管蚜在我国基本上营专性孤雌生殖及其远距离迁飞的事实相符合。

3.2 等位变异数及多态性信息含量分析

多态性信息含量是 DNA 的多态性指标,相对于等位变异数,它更能反映引物在该位点扩增产物的丰富度。而 1 个位点的等位基因丰度越高,它能揭示的个体间的差异也越大。因此,综合这两项指标可以判断,相对于其他 4 对引物,S49 位点的微卫星引物能更好的揭示个体间的遗传多态性。

此外,根据微卫星的原理可知,微卫星位点的多态性是由于其重复的次数及程度不同造成的(晏鹏等,2003)。因此,其进化方向在一般情况下也表现为重复单位的重复次数增加(Valdes, 1993)。S49 位点在等位变异数和多态性信息含量指标上均高于其他检测位点,这也表明,不同地理种群之间,S49 位点经历了较快的进化。

3.3 同一年份、不同地区、不同体色型麦长管蚜种群之间的遗传距离及聚类分析

分别对单一的红体色、绿体色以及 2 种体色的混合种群进行聚类分析,结果显示,4 个地区绿色种群的聚类结果与混合种群的聚类结果完全一致。这一结论表明,绿色个体可能在整个种群中占据着数量上的优势,这与田间观察到的绿色个体为优势种的现象一致。因此,绿色个体对整个种群亲缘关系的判别起着主导作用。

此外,当仅考虑红色个体时,其聚类结果与前者有一定区别。这主要是因为把体色这一因素单独考虑,其在整个种群中的特殊性就会被放大突显出来。但值得注意的是,这种差异仅仅表现在聚类图谱相对近的遗传距离分支上,它仍然没有违背不同体色个体同属一个种的遗传背景。

3.4 分子方差分析

对不同地理种群和不同体色型麦长管蚜种群内和种群间的变异度进行分析,结果表明,对麦长管蚜来讲,其遗传分化主要以种群内的变异为主。这也证明了麦长管蚜的迁飞扩散促进了种群间的基因交流,从而使相距遥远的种群的遗传分化程度降低,具体表现为种群间的变异度占总变异度的比例偏小。

已有文献报道,基于微卫星标记的蚜虫种群遗传研究,习惯把 0.05 作为一个临界值,当 $F_{st} < 0.05$,表示种群之间没有明显分化(Llewellyn *et al.*, 2003)。当分别把混合种群(包括红、绿体色)和单一红色种群的不同地理种群进行分析时,其 F_{st} 值均大于 0.05,这说明尽管种群内变异为主导,但不同地理种群之间仍存在明显的遗传分化,只是频繁的基因交流把这种变异给弱化了。Wright(1951)的理论支持这一观点,他认为种群间的基因流指数 Nm 值若大于 1,则能发挥其使遗传构造均质化的功能。

当把红、绿 2 种体色麦长管蚜作为不同种群进行分析时,发现其 F_{st} 值仅为 0.051,但 Nm 值为 4.697,这表明麦长管蚜红、绿色型之间的遗传分化并不显著,2 种体色型之间并没有生殖隔离,存在比较频繁的基因交流,即它们之间具有相同的遗传背景。因此,推测引起麦长管蚜体色变化的原因可能是来自外界的选择压力。杜桂林等(2007)的研究表明,温度是影响麦长管蚜体色变化的主导因素,在已设定的温度梯度范围内,红色蚜型占麦长管蚜种群的比例随温度的升高而增加。而对于一种营孤雌生殖的蚜虫而言,如果色型之间的转变因环境引起,则色型之间应该无遗传多样性差异。另外,最近对于豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 的研究表明,蚜虫体色的变化可能与蚜虫的内共生菌有关(Tsuchida *et al.*, 2010)。

参考文献(References)

- 曹雅忠,李克斌,尹姣,张克诚,李贤庆,2006. 小麦蚜虫不断猖獗原因及控制对策的探讨. 植物保护,32(5):72—75.
- 曹雅忠,李世功,1990. 麦蚜及其综合治理//李光博,曾士迈,李振歧主编. 小麦病虫害鼠害综合治理. 北京:中国农业科技出版社. 316—339.
- 陈生斗,胡伯海,2003. 中国植物保护五十年. 北京:科学

黑龙江大豆蚜种群动态及田间空间分布研究*

刘兴龙** 李新民 刘春来 王克勤 王爽 夏吉星 杨帆 邵天玉 徐伟钧***

(黑龙江省农业科学院植物保护研究所 哈尔滨 150086)

摘要 2007—2009 年对黑龙江大豆蚜田间种群动态的调查结果表明,6 月中旬大豆蚜 *Aphis glycines* Matsumura 开始在田间出现,3~5 周后田间有蚜株率达到 100%。7 月末至 8 月初蚜量达到高峰期,9 月中下旬在田间逐渐消失。大豆蚜有翅蚜与无翅蚜的发生动态基本一致,有翅蚜高峰期有时会稍有提前。2007 年大豆蚜发生时期早、基数大、增长周期长导致高峰期蚜量显著高于 2008 年和 2009 年。大豆蚜田间分布聚集度指标 $I > 0$ 、 $m^*/m > 1$ 、 $Ca > 0$ 、 $C > 1$, 整个生长季种群都表现为聚集分布。建立的 Iwao 回归关系方程($m^* = 7.14758 + 1.11200m$)表明种群分布的基本成分为个体群,个体之间表现为相互吸引。

关键词 大豆蚜, 种群动态, Iwao 回归法, 空间分布

Population dynamics and spatial distribution pattern of *Aphis glycines* in Heilongjiang Province

LIU Xing-Long** LI Xin-Min LIU Chun-Lai WANG Ke-Qin

WANG Shuang XIA Ji-Xing YANG Fan SHAO Tian-Yu XU Wei-Jun***

(Plant Protection Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract A field survey of the population dynamics of the soybean aphid, *Aphis glycines* Matsumura, was conducted during growing seasons from 2007 to 2009 in Heilongjiang Province, northeastern China. The results show that aphids colonized soybeans in the middle of June, and that nearly 100% of plants were colonized in the next 3 to 5 weeks. The peak abundance of soybean aphids occurred in early August after which the population began to decline in mid-August. In 2007, colonization occurred relatively early and initial densities were obviously higher than in 2008 and 2009. The aggregation index of *A. glycines* distribution in the field was $I > 0$, $m^*/m > 1$, $Ca > 0$, $C > 1$, indicating a clustered spatial distribution throughout the growing season. The Iwao regression equation was $m^* = 7.14758 + 1.11200m$, suggesting that the basic component of population distribution is individual colonies and that individuals attract each other.

Key words *Aphis glycines*, population dynamics, Iwao regression analysis, spatial distribution pattern

大豆蚜 *Aphis glycines* Matsumura 起源于亚洲东部地区,在欧洲部分地区和非洲都有分布,是危害大豆的重要害虫之一。国内各大豆产区广泛分布,尤以东北大豆产区为害最重。并于 2000 年传入美国,现已扩散到美国 21 个州及加拿大的安大略等 3 个省,造成严重产量损失(Ragsdale *et al.* 2004)。大豆蚜是异寄主全周期昆虫,冬寄主为鼠李科植物,夏寄主为栽培大豆和野生大豆。秋季气温下降时由大豆迁飞到鼠李科植物上,雌蚜与

迁回的雄蚜交配产卵,以卵在鼠李枝条的芽腋和缝隙间越冬。翌年春天卵孵化产生孤雌蚜在鼠李上繁殖,大豆出苗后迁飞到大豆植株上(张履鸿, 1993)。大豆蚜田间分布的聚集程度随着不同阶段而变化(史树森等,1994),不同地区大豆蚜在田间发生动态也有差异,吉林大豆蚜在 7 月上中旬蚜量达到最多(王素云等,1996),山东地区则在 8 月上旬蚜量达到高峰(李长松等,2000)。黑龙江是我国的大豆主产区,大豆蚜是生产中的重点防

* 资助项目:公益性行业(农业)科研专项(201103022)。

** E-mail: 13804505330@163.com

*** 通讯作者, E-mail: xu.weijun@163.com

收稿日期:2011-09-15, 接受日期:2011-10-28