

不同桃树品种上桃蚜遗传多样性的研究^{*}

盛 琼 李 杰 曹进军 刘小侠 张青文^{**}

(中国农业大学昆虫系 北京 100193)

摘 要 桃蚜 *Myzus persicae* (Sulzer) 寄主广泛, 是一种全球性的广食性害虫。为了探明不同桃树品种对桃蚜遗传分化的影响, 我们采用微卫星分子标记技术对白油蟠桃, 黄油蟠桃等 7 个桃树品种上的桃蚜进行遗传多样性研究。结果表明, 7 对微卫星引物在 171 个样本中检测到 118 个等位基因, 平均每个位点有 16.857 个等位基因。不同品种桃树上桃蚜的遗传多样性较为丰富, 表明种内存在着较大的遗传变异。种群间没有遗传分化或分化不明显, 这可能是种群间存在着明显的基因交流而造成的, 说明桃树品种间的差异对桃蚜的分化影响较小。

关键词 桃蚜, 不同桃树品种, 遗传多样性, 遗传分化

Genetic diversity of *Myzus persicae* on different peach varieties

SHENG Qiong LI Jie CAO Jin-Jun LIU Xiao-Xia ZHANG Qing-Wen^{**}

(Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract *Myzus persicae* (Sulzer) is a global euryphagous pest with a range of host species. We used microsatellite markers to analyze the genetic diversity of *M. persicae* populations from white flat nectarines, yellow flat nectarines, and 5 other kinds of peach trees. In all, 118 alleles were detected at 7 microsatellite loci from 171 samples with an average per locus of 16.857 alleles. The populations from different kind of peach trees displayed high levels of genetic diversity, indicating that most genetic variation was intraspecific rather than between populations. No obvious differentiation was detected between pairwise populations suggesting gene flow between populations. These results indicate that *M. persicae* populations on different peach varieties are genetically similar.

Key words *Myzus persicae*, different peach varieties, genetic diversity, genetic differentiation

桃蚜 *Myzus persicae* (Sulzer), 别名烟蚜、桃翅蚜, 属同翅目 (Homoptera) 蚜科 (Aphididae), 是一种全球性的广食性害虫, 寄主植物已达到 50 多科 400 多种 (Weber, 1985)。桃蚜通过刺吸汁液、传播病毒等造成作物植株矮小, 叶片黄化、卷缩, 使作物的产量和品质下降 (Le-Feuvre *et al.*, 2007), 对农业生产造成严重的经济损失。

微卫星标记 (microsatellite), 又称为简单重复序列 (simple sequence repeats, SSR)。微卫星广泛的分布于真核生物基因组中, 由 2~6 个核苷酸的串联重复片段构成。相对于其它的分子标记方法, 微卫星标记具有可重复性强, 对模板 DNA 要求低, 多态信息含量高, 共显性遗传等优点。桃蚜作为农业上危害较为严重的害虫, 微卫星研究应

用的较多。陈磊等 (2005) 用微卫星引物 PCR 方法分析了烟草、油菜、甘蓝 3 种不同寄主植物上桃蚜红、绿两种体色生物型的 DNA 多态性。韩明花等 (2009) 采用微卫星分子标记技术, 对西兰花、桃树、辣椒上的桃蚜种群进行遗传多样性和遗传结构研究, 探讨了桃蚜在不同寄主上的遗传分化的特点。刘永刚等 (2010) 利用 7 对 SSR 引物对 13 个桃蚜地理种群进行遗传相似性和聚类分析, 探讨甘肃不同地理种群桃蚜的遗传相似性和遗传差异, 遗传距离与地理距离、海拔之间的关系, 为桃蚜种群遗传分化和迁飞提供分子证据。

目前, 许多研究表明, 桃蚜与寄主植物在协同进化的过程中, 长期取食某种植物类群产生了一定的专化适应性, 在不同寄主植物上存在种群分

^{*} 资助项目: 现代农业产业技术体系项目资助 (CARS-29-08)。

^{**} 通讯作者, E-mail: zhangqingwen@263.net

收稿日期: 2012-06-26, 接受日期: 2012-08-30

化现象(韩明花等,2009),而关于桃蚜在不同品种的桃树上是否也存在着种群分化的现象则未见报道。本文拟采用微卫星标记方法,研究油桃、毛桃等 7 个桃树品种上桃蚜的遗传多样性,分析不同桃树品种上桃蚜的遗传分化和遗传结构,以期为不同桃树品种桃蚜的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品的采集

供试桃蚜于 2011 年 6 月在北京市农林科学院的桃树品种资源圃中采集。为了使样本具有最大的代表性,每头蚜虫均在间隔 5 m 以上的距离采集,以尽量避免采集到同一孤雌蚜的后代。共采集到油桃、黄油蟠桃、白蟠桃、黄蟠桃、白油蟠桃、白毛桃、黄毛桃这 7 个桃树品种 171 个样本。蚜虫样本用无水乙醇浸泡, -20°C 保存备用。

1.2 基因组 DNA 的提取

单独提取每头桃蚜的基因组 DNA,提取方法参照 Doyle 和 Doyle (1987) 的 CTAB 法并稍加改进。提取后用微量紫外分光光度计 (NanoDrop 2000C) 检测提取的 DNA 的质量和浓度,之后将样品 DNA 稀释到 $40\text{ ng}/\mu\text{L}$, -20°C 保存备用。

1.3 引物获取与 PCR 扩增

本研究用于扩增的微卫星引物序列参照 Sloane 等 (2001) 和 Wilson 等 (2004) 发表的桃蚜相关引物,由上海生物工程有限公司合成。筛选后共获得 7 对多态性高、稳定性好的引物,并由上海生工合成荧光引物 (表 1),其中在引物 M2、M35 和 M49 的正向引物 5' 端加 FAM 荧光基团 (显蓝色);在 M25、M40、M63 和 M86 的正向引物 5' 端加 TAMRA 荧光基团 (显黄色)。

PCR 反应体系为 $10\text{ }\mu\text{L}$,其中包括有 $5\text{ }\mu\text{L}$ 的 $2\times\text{ Taq PCR Master Mix}$ (成分为 4 mmol/L MgCl_2 、 $0.4\text{ mmol/L dNTP mix}$ 和 $0.05\text{ U}/\mu\text{L Taq DNA 聚合酶}$), 2 pmol 的正反向引物各 $1\text{ }\mu\text{L}$ 以及模板 DNA ($40\text{ ng}/\mu\text{L}$) $1\text{ }\mu\text{L}$, DNA 扩增采用 Biometra UNO II 型 PCR 仪。PCR 反应程序为: 95°C 预变性 5 min ; 95°C 变性 30 s , 退火温度下复性 45 s (表 1), 72°C 延伸 60 s , 共循环 40 次;最后 72°C 延伸 5 min , 4°C 停止。

扩增产物送到北京擎科生物有限公司,经 ABI3100 全自动遗传分析仪进行毛细管电泳。

1.4 数据统计与分析

用 GeneMarker 软件读取毛细管电泳基因分型数据,统计到 Excel 表格中。用 PopGene32 (Yeh *et al.*, 1999) 和 Arlequin35 (Excoffier *et al.*, 2005) 对全部种群和各个种群进行遗传参数分析。计算等位基因数 N_a 、有效等位基因数 N_e 、观察杂合度 H_o 、期望杂合度 H_e 、多态性信息含量 PIC、种群内近交系数 F_{is} 、种群间遗传分化指数 F_{st} (Wright (1978) 认为 $F_{st} \leq 0.05$ 时两群体几乎无分化,当 $0.05 < F_{st} \leq 0.15$ 时,种群中度分化,当 $0.15 < F_{st} \leq 0.25$ 时,种群发生明显分化, $F_{st} > 0.25$ 时,种群极度分化)、 $Nei's$ 遗传一致度 I 和 $Nei's$ 遗传距离 (Nei , 1972, 1978)。根据 $Nei's$ 遗传距离,用 MEGA 软件对种群进行 UPMGA 聚类分析。

2 结果与分析

2.1 遗传多样性

7 对微卫星引物在 7 个桃树品种桃蚜共 171 个样本中检测到 118 个等位基因,等位基因数和有效等位基因数分别为 $9 \sim 31$ 和 $3.214 \sim 15.729$ 。观测杂合度在 $0.637 \sim 0.965$ 之间,平均值为 0.797 。相比之下,期望杂合度的值较高,在 $0.691 \sim 0.939$ 之间,平均值为 0.835 。多态性信息含量 PIC 在 0.648 到 0.933 之间 (表 1)。从这些指标中可以看出,所选位点均具有较高的多态性,能够用于微卫星遗传分析。

表 2 中,7 个微卫星位点在 7 个桃树品种桃蚜种群的等位基因数和有效等位基因数分别在 $6.429 \sim 13.429$ 之间和 $3.728 \sim 7.245$ 之间。观察杂合度在 $0.755 \sim 0.843$ 之间,期望杂合度在 $0.732 \sim 0.840$ 之间。除了油桃和黄油蟠桃品种的桃蚜种群外,期望杂合度均小于观测杂合度,即种内近交系数 F_{is} ($F_{is} = 1 - H_o/H_e$, 负值表示杂合子过剩,正值表示杂合子缺失) 小于零,表现为杂合子过剩。

2.2 不同桃树品种桃蚜种群的遗传分化

如表 3 所示,油桃与黄油蟠桃桃蚜种群间的 F_{st} 值最小,为 0.007 ,两种种群间几乎无分化。白油蟠桃与白毛桃桃蚜种群间的 F_{st} 值最大为 0.111 ,两种种群间为中度分化。两两种群间几乎无分化的占 57.14% ($12/21$),其余的均呈中度分化 ($9/21$),占全部的 42.86% 。遗传距离在 $0.097 \sim 0.702$ 之间,其中油桃桃蚜与黄油蟠桃桃蚜种群的

表 1 引物信息及 7 个微卫星位点的遗传多样性

Table 1 Information of the primers and the genetic diversity of the seven microsatellite loci

位点 Local	重复 类型 Repeat type	退火温 度 Ta(℃) Annealing temperature	引物来源 Primer source	等位基 因数 Na Numbers of alleles	有效等位 基因数 Ne Effective numbers of alleles	观察杂合 度 Ho Observed heterozygosity	期望杂合 度 He Expected heterozygosity	多态性信息 含量 PIC Polymorphisms information content
M2	(GA) ₃₀	55	Wilson <i>et al.</i> ,2004	16	6.270	0.749	0.843	0.824
M25	(AG) ₂₄	55	Wilson <i>et al.</i> ,2004	9	3.214	0.690	0.691	0.648
M35	(AT) ₉ – (AC) ₂₂	55	Sloane <i>et al.</i> ,2001	14	7.755	0.728	0.874	0.857
M40	(AC) ₁₇	55	Sloane <i>et al.</i> ,2001	13	4.599	0.965	0.785	0.759
M49	(AC) ₃₁	49	Sloane <i>et al.</i> ,2001	31	15.729	0.959	0.939	0.933
M63	(AC) ₂₉	49	Sloane <i>et al.</i> ,2001	21	7.039	0.854	0.861	0.846
M86	(CA) ₂₃	55	Sloane <i>et al.</i> ,2001	14	6.534	0.637	0.849	0.829
平均 Average				16.857	7.306	0.797	0.835	0.814

表 2 桃蚜的 7 个桃树品种寄主种群的遗传分析

Table 2 Genetic analysis of the 7 *Myzus persicae* peach varieties populations

品种 Varities	样本数 (头) Sample number	等位基因 数 Na Numbers of alleles	有效等位基 因数 Ne Effective numbers of alleles	观察杂合 度 Ho Observed heterozygosity	期望杂合 度 He Expected heterozygosity	种群内近交 系数 Fis Inbreeding coefficient of population
油桃 Nectarine	40	13.429	7.245	0.755	0.840	0.097
黄油蟠桃 Yellow flat-nectarine	40	11.571	6.582	0.814	0.830	0.011
白蟠桃 White flat-nectarine	20	7.571	5.597	0.835	0.819	–0.017
黄蟠桃 Yellow flat Peach	20	8.571	5.850	0.843	0.810	–0.043
白油蟠桃 White flat-nectarine	14	7.429	4.389	0.765	0.764	–0.022
白毛桃 White kansu peach	17	6.429	3.728	0.807	0.732	–0.113
黄毛桃 Yellow kansu peach	20	7.571	4.926	0.779	0.778	–0.013

表 3 桃蚜 7 个种群分化的遗传分化 Fst 值(对角线以下)和遗传距离(对角线以上)

Table 3 Fstvalues (below diagonal) and genetic distance (above diagonal) of 7 Myzus persicae populations							
	油桃 Nectarine	黄油蟠桃 Yellow flat-nectarine	白蟠桃 White flat-nectarine	黄蟠桃 Yellow flat peach	白油蟠桃 White flat-nectarine	白毛桃 White kansu peach	黄毛桃 Yellow kansu peach
油桃 Nectarine		0.097	0.179	0.214	0.435	0.269	0.163
黄油蟠桃 Yellow flat-nectarine	0.007		0.191	0.155	0.433	0.214	0.147
白蟠桃 White flat-nectarine	0.018	0.021		0.301	0.702	0.431	0.193
黄蟠桃 Yellow flat peach	0.026	0.016	0.039		0.604	0.266	0.201
白油蟠桃 White flat-nectarine	0.068	0.070	0.106	0.096		0.550	0.614
白毛桃 White kansu peach	0.051	0.040	0.080	0.049	0.111		0.261
黄毛桃 Yellow kansu peach	0.022	0.019	0.024	0.027	0.107	0.052	

遗传距离最小,表示它们之间亲缘关系最近;白油蟠桃桃蚜与白蟠桃桃蚜种群的遗传距离最大,表明它们之间亲缘关系较远。

分子方差分析(AMOVA)显示,个体间的变异占 95.24%,种群间的变异占 3.78%,遗传分化值 Fst 为 0.0378(表 4)。结果表明种群间存在着低水平的遗传分化,个体间的遗传变异大于种群间的遗传变异,变异主要来自于个体间。

表 4 不同桃树品种桃蚜种群分子方差分析

Table 4 Molecular analysis of variance (AMOVA) of 7 Myzus persicae peach varieties populations

变异来源 Variation sources	自由度 Degree of freedom	平方和 Sum of squares	组内均方 Variance components	变异所占百分比 Percentage of variation	遗传分化值 Fixation indices
种群间 Among populations	6	48.49	0.11Va	3.78	Fst = 0.0378
种群内 Among individuals within populations	164	465.39	0.03Vb	0.98	Fis = 0.0132
个体间 Within individuals	171	475.50	2.78Vc	95.24	Fit = 0.0505
合计 Total	341	989.38	2.92		

注:Va,因素 a 的方差,即种群间的方差;Vb,因素 b 的方差,即种群内的方差;Vc,因素 c 的方差,即个体间的方差。
Va, the variance of factor a, that is the variance among populations; Vb, the variance of factor b, that is the variance among individuals within populations; Vc, the variance of factor c, that is the variance within individuals.

基于各品种间的遗传距离进行聚类分析(图1),可将7个桃树品种桃蚜种群划分为2类,即白油蟠桃桃蚜种群单独为一类,其他6个品种桃蚜

种群为一类。这表明白油蟠桃桃蚜的遗传变异最大,其它品种桃蚜种群彼此间的遗传关系较近。

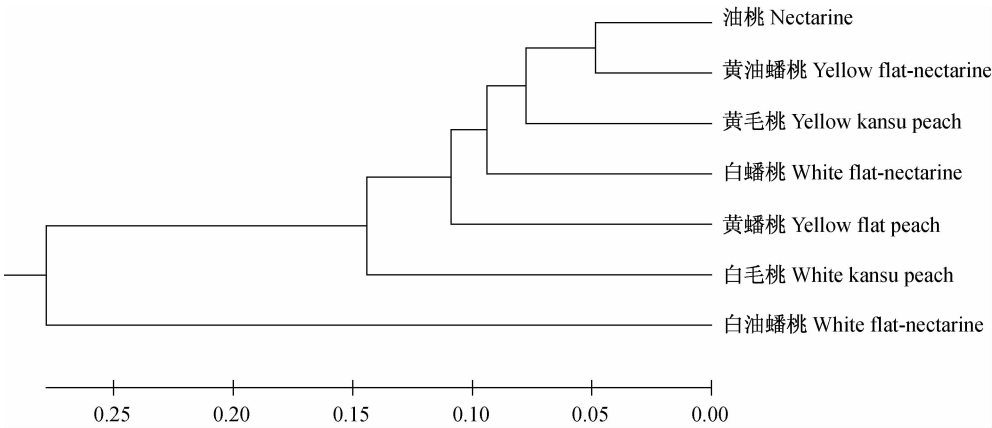


图1 桃蚜7个桃树品种种群间 Nei's 遗传距离的 UPGMA 聚类图

Fig.1 UPGMA consensus tree constructed from Nei's genetic distance depicting the relationship of 7 populations

3 讨论

3.1 群体内的遗传多样性

本研究首次通过微卫星标记对不同品种桃树上桃蚜种群进行遗传分析。我们采用的是 Sloane 等(2001)和 Wilson 等(2004)所发表桃蚜微卫星引物,经筛选后共获得7对多态性好,稳定性高的引物。7对引物对171个样本的分析结果表明,与 Sloane 等(2001)、Wilson 等(2004)和韩明花等(2009)的研究相比,相同位点上具有更多等位基因数,说明这些位点在我们的研究中具有较高的多态性,同时也在一定程度上反映我们采集的样本较为广泛,具有较好地代表性。多态信息含量(PIC)是衡量基因片段多态性的较好指标,当 $PIC > 0.5$ 时,该座位为高度多态性座位;当 $0.25 < PIC \leq 0.5$ 时,该座位为中度多态性座位;当 $PIC \leq 0.25$ 时,该座位为低度多态性座位(Vanhala *et al.*, 1998)。本文中多态性信息含量 PIC 在 0.648 到 0.933 之间,均大于 0.5,说明所有位点均为高度多态性位点,可以用于进一步的遗传分析研究。

该研究的桃蚜群体的平均观测杂合度(H_o)和平均期望杂合度(H_e)分别为 0.797 和 0.835,表明所研究的桃蚜群体存在较大的遗传变异。这可能是与桃蚜存在着转主寄生的原因有关,随着

各种寄主上的桃蚜迁回到桃树上越冬,使得多种等位基因和基因型在桃树上得以聚集,因而使其表现出较高的遗传多样性。这与韩明花等(2009)所得到的结论一致,即桃蚜种内的遗传差异较大。

3.2 群体间的遗传分化

群体间遗传分化指数 F_{st} 是衡量群体间遗传差异的主要指标(傅洪拓等,2010)。本研究得出桃蚜两两群体间的 F_{st} 值在 0.007 和 0.111 之间,其中 57.14% 的群体间无分化(12/21),而 42.86% 的群体间出现中等程度分化(9/21)。分子方差分析(AMOVA)也显示引起种群总体变异的主要因素还是在个体间的差异,种群间的遗传分化 F_{st} 值为 0.0378,表明种群间无分化或分化不明显,这可能是种群间存在着明显的基因交流而造成的。谢贤元(1992)等从生物学特性方面对桃蚜寄主分化的研究认为,桃蚜存在“甘蓝型”和“烟草型”2个差异很大的生物型,即在不同寄主植物上存在种群分化现象;韩明花等(2009)对西兰花、桃树和辣椒3种寄主的研究也表明桃蚜在不同寄主上也都出现了明显遗传分化。他们的结果说明桃蚜在甘蓝上和烟草上经过长期的适应,已经形成了一定的专化适应性,基因交流比较弱,从而产生较明显的遗传分化。相比之下,对于桃蚜而言,无论是生理生化指标还是亲缘关系等方面,桃树品种间的差异要比不同寄主间的差异小得多。

聚类分析显示,油桃,黄油蟠桃上的桃蚜亲缘关系最近,黄毛桃上桃蚜次之,之后依次是白蟠桃、黄蟠桃、白毛桃、白油蟠桃上桃蚜。通过分析,我们猜测可能是颜色的差异而导致桃蚜偏好选择油桃、黄油蟠桃和黄毛桃造成的。蚜虫具有趋色性,因此在害虫防治中我们一般采取黄板诱集蚜虫。随着果实成熟,桃蚜也从转主寄主上迁飞回桃树,由于蚜虫的趋色性,可能使其更多的朝着油桃、黄油蟠桃、黄毛桃等桃树上转移,从而使其在这些桃树上存在着较多的基因交流,产生较近的亲缘关系。当然,其它因素如桃树品种内的物质种类和含量以及人为因素等也可能对桃蚜的遗传分化产生影响。

本研究只选取了 7 种不同桃树品种上的桃蚜进行研究,今后的试验可适当增加种群数,采集的样本量,尽量使样本具有较强的代表性,全面地分析桃蚜的种群分化现象。

参考文献 (References)

- Doyle JJ, Doyle JL, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.*, 19: 11 – 15.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S, 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform.*, 1: 47 – 50.
- Le-Feuvre RR, Ramrez CC, Olea N, 2007. Effect of antimicrobial peptide indolicidin on the green peach aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *J. Appl. Entomol.*, 131(2): 71 – 75.
- Nei M, 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.*, 106: 283 – 292.
- Nei M, 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583 – 590.
- Sloane AM, Sunnucks P, Wilson CCA, 2001. Microsatellite isolation, linkage group identification and determination of recombination frequency in the pesch-potato aphid, *Myzus persicae*. *Gen. Res.*, 77(3): 251 – 260.
- Vanhala T, Tuiskula-Haavisto M, Elo K, 1998. Evaluation of genetic distances between eight chicken lines using microsatellite markers. *Poul. Sci.*, 77: 783 – 790.
- Weber G, 1985. Genetic variability in host plant adaptation of the green peach aphid, *Myzus persicae*. *Entomol. Exper. Appl.*, 38(1): 49 – 56.
- Wilson ACC, Massonnet B, Simon JC, 2004. Crossspecies amplification of microsatellite loci in aphids: assessment and application. *Mol. Ecol. Not.*, 4 (01): 104 – 109.
- Wright S, 1978. Evolution and Genetic Populations. Vol. 4. Chicago: University of Chicago Press. 79 – 103.
- Yeh FC, Yang RC, Boyle TBJ, Ye ZH, Mao JX, 1999. POPGENE: the user-friendly shareware for population genetic analysis. University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada (program available from: <http://www.ualberta.ca/~fyeh/>).
- 陈磊, 张春妮, 仵均祥, 2005. 不同植物上桃蚜两种体色生物型的 DNA 多态性研究. 西北农业学报, 14(4): 127 – 131.
- 傅洪拓, 乔慧, 李法君, 吴滢, 龚永生, 蒋素飞, 熊贻伟, 王宁, 2010. 长江不同江段青虾的遗传多样性. 水产学报, 34(2): 204 – 212.
- 韩明花, 王永模, 王哲, 沈佐锐, 2009. 基于微卫星标记的桃蚜种群寄主遗传分化. 昆虫知识, 46 (2): 244 – 249.
- 刘永刚, 漆永红, 李惠霞, 郭满库, 吕和平, 张俊莲, 贺春贵, 2010. 甘肃不同地理种群桃蚜的遗传相似性. 中国农业科学, 43(15): 3134 – 3142.
- 谢贤元, 1992. 十字花科植物上桃蚜的两个生物型. 植物保护, 18(1): 31 – 32.