

甘肃省麦二叉蚜生物型结构的分子鉴定

Molecular identification for biotypic structure of spring-grain aphid

Schizaphis graminum in Gansu Province郭建国¹ 姜小凤² 刘月英¹ 金社林¹ 袁伟宁¹ 张新瑞^{1*}

(1. 甘肃省农业科学院植物保护研究所, 兰州 730070; 2. 甘肃省农业科学院旱地农业研究所, 兰州 730070)

Guo Jianguo¹ Jiang Xiaofeng² Liu Yueying¹ Jin Shelin¹ Yuan Weining¹ Zhang Xinrui^{1*}

(1. Institute of Plant Protection, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, Gansu Province, China;

2. Institute of Dryland Agriculture, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, Gansu Province, China)

麦二叉蚜 *Schizaphis graminum* 是一种世界性害虫。早期染色体长度测量曾为科学认识其生物型提供了方法,但操作性和准确性有待加强。欧美国家率先利用鉴别寄主反应型鉴定出了 11 种生物型,国内利用该技术发现了 CHN-I 生物型,该方法虽操作性强,但易受寄主适生性与人为因素干扰,监测系统性有待提升。随着分子生物学技术快速发展,基因检测技术备受青睐,已成为自然种群遗传分化检测的重要工具。本研究基于甘肃省 50 个麦二叉蚜 Mt DNA *COI* 基因序列,以极大似然法构建系统树,旨在明确其生物型结构,以期抗性品种的合理布局提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试虫源:于 2014—2015 年在甘肃省的河西灌溉绿洲农业区的酒泉市(JQ)金塔县航天镇(JTHT)和玉门市花海镇(YMHH),张掖市(ZY)甘州区小满镇(GZXH)、高台县城关镇(GTCG)、民乐县洪水镇(MLHS),武威市(WW)凉州区永昌镇(LZYC)、民勤县大滩乡(MQDT)、古浪县大靖镇(GLDJ);中部干旱雨养农业区的白银市(BY)景泰县草窝滩镇(JTCWT)、靖远县大芦乡(JYDL),兰州市(LZ)永登县中川镇(YDZC)、皋兰县忠和镇(GLZH)、安宁区农业科学研究院(ANNKY)、榆中县和平镇(YZHP),定西市(DX)安定区李家堡镇(ADLJB)、临洮县玉井镇(LTYJ)、通渭县马营镇(TWMY);陇东半湿润半干旱农业区的平凉市(PL)静宁县威戎镇(JN-WR)、庄浪县水洛镇(ZLSL)、华亭县东华镇(HT-DH)、崇信县锦屏镇(CXJP)、灵台县西屯乡

(LTXT),庆阳市(QY)镇原县临泾乡(ZYLJ)、环县八珠乡(HXBZ)、华池县悦乐镇(HCYL)、西峰区肖金镇(XFXJ)、正宁县山河镇(ZNSH)、宁县长庆桥镇(NXCQQ);南部湿润农业区的天水市(TS)甘谷县金山乡(GGJS)、甘谷县新兴镇(GGXX)、秦安县中山乡(QAZS)、秦安县刘坪乡(QALP)、清水县红堡镇(QSHB)、清水县秦亭镇(QSQT)、秦州区玉泉镇(QZYQ)、武山县杨河乡(WSYH)、武山县洛门镇(WSLM)、张家川回族自治县马鹿镇(ZJCML)、张家川回族自治县刘堡镇(ZJCLB),陇南市(LN)成县城关镇(CXCG)、成县宋坪乡(CXSP)、宕昌县临江镇(TCLJ)、两当县城关镇(LDCG)、西和县汉源镇(XHHY)、武都区城关镇(WDCG)、文县碧口镇(WXBK)、文县尖山乡(WXJS)、康县平洛镇(KX-PL)、徽县江洛镇(HXJL)、礼县城关镇(LXCG)共采集 50 个麦二叉蚜地理种群样本,分别于 4 mL 95% 乙醇的 5 mL 离心管中-4℃ 保存备用。

试剂及仪器:CTAB 裂解液、TE 缓冲液、10×Buffer、*Taq* DNA 聚合酶和 dNTPs,美国 Sigma-Aldrich 公司;其它试剂均为国产分析纯。PTC 200 PCR 仪、Power Pac300™电泳仪,美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

Mt DNA 提取和 PCR 扩增:改良 CTAB 法提取 Mt DNA,30 μL PCR 反应体系:上游引物 LepF(5'-ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG-3')和下游引物 LepR(5'-TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA-3')各 0.6 μL、超纯水 21 μL、10×Buffer(含 Mg²⁺) 3 μL、*Taq* DNA 聚合酶 0.4 μL、2.5 mmol/L dNTPs 2.4 μL、DNA 模板 2 μL。产物经 1% 琼脂糖凝胶电

泳检测,合格样品委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行双向测序。扩增条件:95℃预变性5 min;95℃变性0.5 min,48~50℃退火0.5 min,72℃延伸1 min,35个循环。

序列比对分析:利用DNASar 5.01软件拼接和校对序列,利用Editseq软件检验蛋白质翻译的正确性,利用DAMBE 5.3.48软件对核苷酸序列进行饱和性和分析,BLAST同源性比对Mt DNA COI基因,基于极大似然法利用Mega 7.0软件构建系统发育树,利用K-2P模型计算遗传距离。

2 结果与分析

2.1 麦二叉蚜基因扩增及饱和性分析

甘肃省麦二叉蚜50个地理种群Mt DNA COI基因PCR扩增产物条带清晰可见,符合DNA条形码检测需求。50条Mt DNA COI基因经拼接比对后获得640 bp序列,639 bp序列100%编码213氨基酸。序列间转换、颠换数值随模型遗传距离呈现线性增长,未达饱和,可用于后续分析。

2.2 麦二叉蚜50个地理种群的系统发育树

甘肃省麦二叉蚜50个地理种群中共检出B、C、E、G、H、I共6种生物型,B、C、E型比例高达72%,为优势生物型,G、H、I型比例仅为28%,为非优势生物型。河西干旱灌溉绿洲农业区8个地理种群与第I进化支的E型聚为一支;中部干旱雨养农业区9个地理种群分别与第I进化支的E型和I型聚为一支;陇东半湿润半干旱农业区11个地理种群分别与第II进化支的G型和第IV进化支的H型聚为一支;南部湿润农业区22个地理种群分别与第III进化支的B型和第I进化支的C型聚为一支(图1)。

2.3 麦二叉蚜生物型之间的遗传距离

6种生物型平均遗传距离为0.028,C型与E、I型,E型与I型遗传距离介于0~0.002,生物型相近;C、E和I型与G型遗传距离介于0.014~0.017,生物型相距较远;B型与C、E、G、H、I型,C、E、G、I型与H型遗传距离介于0.035~0.052,生物型相距最远。

3 讨论

麦二叉蚜寄生适合度广,选择压力增加易使种群演化出新生生物型。本研究结果发现甘肃省麦二叉蚜由6种生物型组成,B、C、E型为优势生物型;Mt DNA COI基因测序深度与Kharrat et al.(2012)研究结果相近,可在分子水平鉴别生物型组成;甘肃省麦二叉蚜具有寄主特异性和地理区域性,生物型在生态分布上既有一定重叠性,又有部分生殖隔离现象。这与Weng et al.(2010)研究结果相互印证。

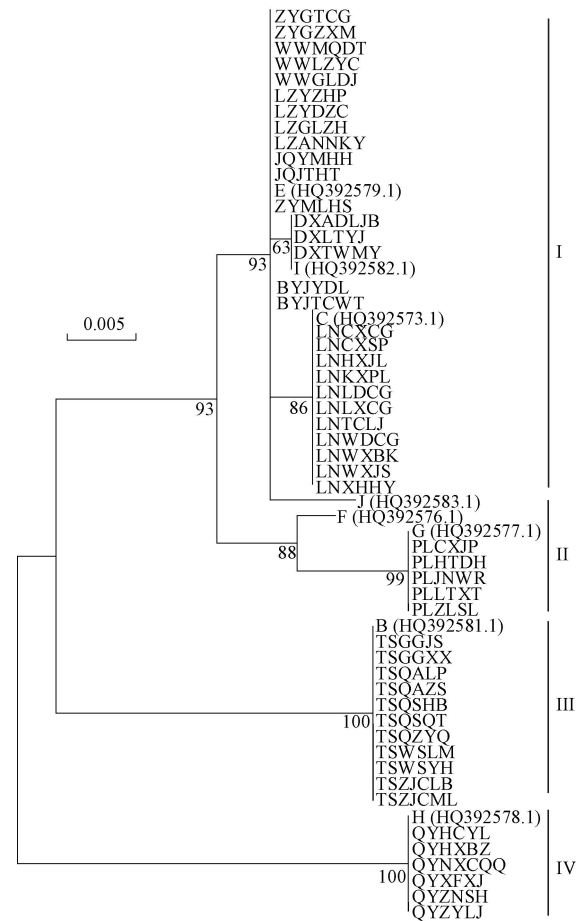


图1 基于COI序列构建甘肃省麦二叉蚜50个地理种群的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of 50 geographic populations of *Schizaphis graminum* based on COI sequence in Gansu Province

B、C、E、G、H、I和J代表不同生物型。种群命名规则:第1和第2个字母表示种群样本的所在市名缩写,第3和第4个字母表示市或者区或者县名缩写,剩下的字母表示镇或者乡名缩写。B、C、E、G、H、I and J represented different biotypes. In the population names, the 1st and 2nd letters represent abbreviation of provincial capital name, the 3rd and 4th letters represent abbreviation of city, district or county under the province and the others letters are abbreviation of town or country.

参考文献 (References)

- Kharrat I, Mezghani-Khemakhem M, Bouktala D, Makni M. 2012. The greenbug, *Schizaphis graminum* Rondani (Hemiptera: Aphididae), in Tunisia: mitochondrial DNA divergence and haplotype inference. *Journal of the Entomological Research Society*, 14(1): 77-82
- Weng YQ, Perumal A, Burd JD, Rudd JC. 2010. Biotypic diversity in greenbug (Hemiptera: Aphididae): microsatellite-based regional divergence and host-adapted differentiation. *Journal of Economic Entomology*, 103(4): 1454-1463

(责任编辑:张俊芳)