

美国白蛾种群遗传分化的 RAPD 分析*

阚国仕^{1**} 李 雪¹ 丁建云²

(¹ 沈阳农业大学生物科学技术学院, 沈阳 110161; ² 北京市植物保护站, 北京 100029)

摘 要 应用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术, 对 9 个不同地理种群美国白蛾进行了遗传多样性和 UPMGA 聚类分析。结果表明 25 个 RAPD 引物共扩增 191 个位点, 片段大小在 200 ~ 2000 bp, 其中 158 个是多态位点, 多态百分率为 82.72%, 遗传距离指数在 0.2043 ~ 0.5108, 遗传相似性系数在 0.4892 ~ 0.7957。9 个不同地理种群的美白蛾可以分成 3 类: 辽宁省和山东类群、北京和天津类群、美国类群, 表明美国白蛾不同地理种群间的遗传分化与地理位置相关。

关键词 美国白蛾; RAPD; 遗传分化

中图分类号 Q346 文献标识码 A 文章编号 1000-4890(2009)10-2032-05

RAPD analysis on genetic differentiation of *Hyphantria cunea* populations. KAN Guo-shi¹, LI Xue¹, DING Jian-yun² (¹ College of Biological Science and Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China; ² Plant Protection Station of Beijing, Beijing 100029, China). *Chinese Journal of Ecology* 2009 28(10) 2032-2036.

Abstract: The genetic diversity and UPMGA clustering of nine *Hyphantria cunea* geographic populations were analyzed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. A total of 191 bands were obtained from 25 effective primers, of which, 158 bands were polymorphic, accounting for 82.72%. The genetic distance index of the populations was 0.2043-0.5108, and the similarity coefficient was 0.4892-0.7957. The nine populations could be divided into three groups, *i. e.*, Liaoning and Shandong group, Beijing and Tianjing group, and American group, suggesting that the genetic differentiation of *H. cunea* populations was correlated with geographical location.

Key words: *Hyphantria cunea*; RAPD; genetic differentiation.

随着全球经济一体化进程的加快, 生物入侵的现象越来越普遍, 我国是全球受外来生物入侵影响最大的国家之一(万方浩等 2005)。其所带来的影响也越来越严重, 已经成为危害生物多样性、生态环境和国民经济的一个十分重要和紧迫的问题(成新跃和徐汝梅, 2007)。美国白蛾 (*Hyphantria cunea*) 是世界性检疫害虫, 其原本分布在北美, 于 20 世纪 40 年代传入中欧和东亚(Warren & Tadic, 1970, Umeya & Itô, 1977), 1979 年在中国辽宁省首次发现该虫, 逐步蔓延扩散, 目前已在我国辽宁、山东、河北、陕西、天津、上海等省市发生(亢雅娟 2006)。美国白蛾幼虫食性杂, 繁殖量大, 适应性强, 传播途径广,

危害多种林木和果树, 树叶吃光后就危害附近的农作物、蔬菜及野生植物(季荣等 2003)。大爆发时害虫还会成群地进入房屋或者爬上停放的汽车, 影响居民的生活。目前仅美国白蛾、松材线虫、松土圆蚧、湿地松粉蚧、松干蚧等 5 种外来入侵生物在我国每年危害的森林面积就高达 150 万 hm^2 , 严重威胁到养蚕业、林果业和城市绿化。由于美国白蛾寄主广泛, 常在新传入地爆发成灾, 对入侵地的城市绿化树木和农作物造成严重破坏(张四才等 2006)。美国白蛾是非迁飞性害虫, 以老熟幼虫在当地越冬。美国白蛾自然传播是靠其成虫、幼虫实现的, 成虫一次可飞行 70 m, 可被大风吹到数百米甚至数千米远的地方(金传玲, 1999), 美国白蛾的远距离传播主要是依靠运输工具。

* 北京市植物保护站专项基金资助项目(D0706003050164-2007-3)。

** 通讯作者 E-mail: kanguoshi@163.com

收稿日期: 2009-01-23 接受日期: 2009-06-16

RAPD 分子标记由于具有操作简便、成本低、不需知道待测样品的序列信息、对 DNA 质量要求不高等特点已被广泛应用于昆虫遗传变异分析,分类等领域。如,傅建伟等(2008)用 RAPD 技术对福建省内 19 个不同菜区的黄曲条跳甲(*Phyllotreta striolata*)进行遗传分化研究,杨效文等(1999)用 RAPD 方法研究了我国烟蚜种群的寄主分化和地理分化,栢栋等(2007)利用 RAPD 分子标记分析烟粉虱生物型遗传结构差异。在我国关于美国白蛾生物学特性(苏茂文等 2008,鞠珍等 2008)、防治和监控(高德三,1990)等方面已有较为深入的研究。但是,关于美国白蛾不同地理种群间的遗传分化尚未见报道。本研究以采自不同地区的美国白蛾为实验材料,采用随机扩增多态性 DNA(RAPD)技术,对 9 个不同地区美国白蛾种群间的遗传分化进行研究,为进一步分析其进化潜力和重点预防及消除危害提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

分别在辽宁省沈阳、庄河、鞍山、丹东、葫芦岛市、山东东营、天津市、北京市、美国德克萨斯州共 9 个地方采集美国白蛾幼虫,活虫饥饿 24 h 后用无水乙醇浸泡带回实验室, -20 °C 保存。

1.2 主要试剂与仪器

TaqDNA 聚合酶(sloarbio)、dNTPmix(天根生物)、蛋白酶 K(Amresco 分装)、DNAMarkerDL2000(东盛科技)、RAPD 引物赛百盛 Agarose(Spanish),其余试剂为国产分析纯。仪器为 Eppendorf 低温冷冻离心机, Biometra Tgradient PCR 仪,六一厂 DYY-5 型稳压稳流电泳仪、六一厂 DYY-II 型电泳槽、美国 UVP 凝胶成像系统。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取与检测 DNA 的提取方法参照印红等(2002)、张德华等(2004)的方法进行改进。取一头美国白蛾幼虫标本,放入 2 ml 灭菌 PBS 中, 37 °C 浸泡 2 h。浸泡处理过的标本组织用无菌双蒸水漂洗 2 次,吸干标本表面液体。取 100 mg 处理过的标本组织,在液氮中研磨成粉末,迅速在加入裂解液(Tris-HCl 0.1 mol · L⁻¹ pH 7.0, EDTA 5 mmol · L⁻¹, NaCl 0.5 mmol · L⁻¹, 1.25 mg · ml⁻¹蛋白酶 K; 25% SDS 100 μl),于 55 °C 水浴 5 h,再加入 RNA 酶

A(终浓度 10 μg · ml⁻¹) 37 °C 温育 30 min,再加入等体积的酚:氯仿(1:1)抽提,离心后收集水相,加入 2 倍体积无水乙醇,置 -20 °C 冰箱内 30 min,离心后将沉淀晾干,加入 30 μl 灭菌双蒸水,测定浓度,将 DNA 制成浓度为 50 ng · μl⁻¹,放置于 -20 °C 备用。

1.3.2 引物筛选 随机引物采用赛百盛公司 SBSC 和 SBSE 两套引物共 40 个,经 3 次重复试验筛选出扩增条带清晰、稳定的引物 25 个。

1.3.3 RAPD 扩增及产物检测 9 个地理种群,每个种群随机选取 20 个个体 DNA,每个 DNA 中吸取 2 μl 混合均匀,作为 RAPD 扩增的模板。RAPD 扩增反应条件:每个循环 94 °C 变性 30 s, 38 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 60 s,共 35 个循环,循环完成后于 72 °C 延伸 5 min,PCR 产物于 4 °C 保存。反应体系为 20 μl,模板浓度 1.25 ng · μl⁻¹、引物浓度 1.2 ng · μl⁻¹、dNTP 浓度 0.2 mmol · L⁻¹、Mg²⁺ 浓度 3.0 mmol · L⁻¹、TaqDNA 聚合酶用量 2.5 U。扩增产物在 1 × TAE, 1.5% 琼脂糖,100 V 电压下电泳 1 h,在含 0.5 μg · ml⁻¹溴化乙锭溶液中染色 20 min。UVP 凝胶成像系统下拍照记录结果。

1.3.4 数据统计 在电泳图谱上同一引物扩增产物的电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性,属于同一位点产物。每条扩增片段计作一个位点,每个样品的扩增带按有或无记录,有带计为 1,无带计为 0。列出 0/1 矩阵,并据此计算多态位点百分率 $P = (\text{群体的多态位点数} / \text{位点总数}) \times 100\%$ 。将 0/1 矩阵输入 NTSYSpc 2.0 软件,计算个体间的 Nei 相似性系数(I)、遗传距离(D)根据 Nei 公式计算 $D = 1 - I$ 。根据遗传距离(D)进行 UPMGA 聚类,构建 9 个不同地理种群美国白蛾的聚类关系图。

2 结果与分析

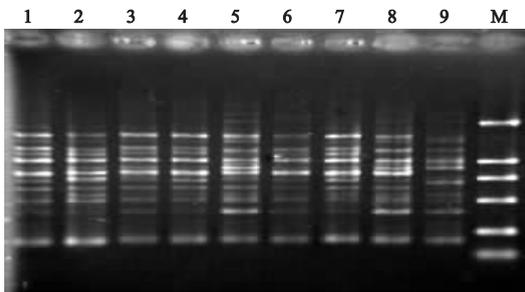
2.1 RAPD 扩增结果

用 25 条 10 碱基随机引物对 9 个不同地理种群的美国白蛾基因组 DNA 进行了 RAPD 分析,每个引物检测到的位点数在 3 ~ 15,共检测到 191 个可重复的位点。扩增片段大小在 200 ~ 2000 bp。平均每个引物检测到的位点为 7.6。引物名称、序列及检测到条带数见表 1。图 1 为不同地理种群美国白蛾用 SBSC8 和 SBSC12 两个不同引物扩增的结果。从图 1 可以看出,同一引物在不同地理种群间扩增国内种群差异较小,美国种群差异较大。

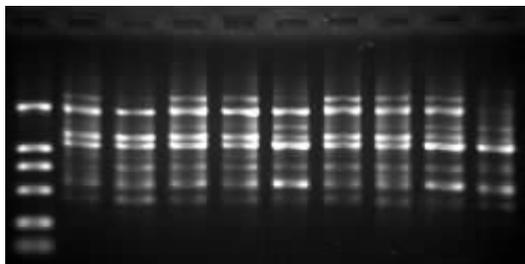
表 1 25 个随机引物序列及扩增的总带数

Tab. 1 25 random primers sequences and the number of amplification band

引物	引物序列 (5'-3')	总位点数	多态位点数	引物	引物序列 (5'-3')	总位点数	多态位点数
SBSC1	TTCGAGCCAG	12	9	SBSC14	TGCCTGCTTG	3	3
SBSC6	GAACGGACTC	10	9	SBSC15	GACGGATCAG	3	3
SBSC7	GTCCCACGA	15	15	SBSC16	CACACTCCAG	4	4
SBSC8	TGGACCGGTG	10	10	SBSC19	GTTGCCAGCC	4	3
SBSC12	TGTCATCCCC	9	9	SBSC20	ACTTCGCCAC	3	3
SBSC13	AAGCCTCGTC	5	2	SBSE1	CCCAAGGTCC	8	5
SBSE2	GGTGGGGAA	3	2	SBSE3	CCAGATGCAC	9	7
SBSE5	TCAGGGAGGT	9	8	SBSE6	AAGACCCCTC	10	6
SBSE7	AGATGCAGCC	7	5	SBSE8	TCACCAGGTT	10	9
SBSE9	CTTACCCGA	5	5	SBSE12	TTATCGCCCC	10	7
SBSE15	ACGCACAACC	8	6	SBSE17	CTACTGCCGT	7	5
SBSE18	GGACTIONCAGA	13	12	SBSE19	ACGGCGTATG	8	6
SBSE20	AACGGTGACC	6	5	总计		191	158



引物 SBSC8



引物 SBSC12

图 1 引物 SBSC8 和 SBSC12 对 9 个种群美国白蛾扩增结果

Fig. 1 Primers SBSC8 and SBSC12 amplified nine populations of *Hyphantria cunea*

泳道 M: DL2000 marker; 泳道 1-9 分别为: 沈阳、庄河、鞍山、丹东、葫芦岛、山东、天津、北京、美国种群。

2.2 遗传多样性分析

25 条随机引物在 9 个地理种群中共扩增出 191 条扩增片段,其中多态片段 158 条,平均每条引物扩增出多态性条带 6.32 条,多态位点百分率为 82.72%,说明遗传变异较高。9 个地理种群中以辽宁省鞍山市多态位点百分率最高,为 60.53%,美国种群多态位点百分率最低,为 37.37%(表 2)。

2.3 地理种群间的遗传距离指数和遗传相似系数

25 个多态引物的扩增结果、遗传相似性指数和

遗传距离指数见表 3。从表 3 可见,美国白蛾 9 个地理种群间的遗传相似性指数的变化范围为 0.4892 ~ 0.7957,遗传距离指数为 0.2043 ~ 0.5108。辽宁省鞍山市与辽宁省庄河市两个地理种群间的遗传距离最小,为 0.2043,美国种群与辽宁省沈阳市地理种群间的遗传距离为 0.5108,为各个地理种群间遗传距离最大的,在国内 8 个种群中北京市与辽宁省沈阳市的遗传距离最大 0.3720。

2.4 美国白蛾地理种群间的聚类关系

运用 NTSYSpc 2.0 软件,采用非加权的组平均法,得到 9 个地理种群间的聚类关系图(图 2)。9 个地理种群间,辽宁省鞍山市与庄河市之间遗传距离最小,其次是天津市与北京市之间。辽宁省沈阳市与美国种群的遗传距离最大,在国内 8 个美国白蛾种群中北京市与辽宁省沈阳市的遗传距离最大。

表 2 9 个不同地理种群美国白蛾的遗传多样性分析

Tab. 2 Genetic diversity of nine populations of *Hyphantria cunea*

地理种群	扩增条带数	多态位点百分率
沈阳	112	58.64
庄河	102	53.40
鞍山	115	60.21
丹东	102	53.40
葫芦岛	99	51.83
山东	107	56.02
天津	99	51.83
北京	90	47.12
美国	71	37.17
总位点数	191	
多态位点数	158	82.72

表 3 9 个不同地理种群美国白蛾遗传相似性及遗传距离

Tab.3 Genetic identity and genetic distance of nine geographic populations of *Hyphantria cunea*

地理种群	沈阳	庄河	鞍山	丹东	葫芦岛	山东	天津	北京	美国
沈阳		0.6935	0.7634	0.6661	0.7312	0.6828	0.6505	0.6280	0.4892
庄河	0.3065		0.7957	0.7043	0.7796	0.6882	0.7312	0.7258	0.5753
鞍山	0.2366	0.2043		0.6935	0.7581	0.7688	0.6989	0.7258	0.4992
丹东	0.3339	0.2957	0.3065		0.7312	0.7419	0.5968	0.6287	0.5161
葫芦岛	0.2688	0.2204	0.2419	0.2688		0.7258	0.6828	0.7312	0.5591
山东	0.3172	0.3118	0.2312	0.2581	0.2742		0.6667	0.7043	0.5215
天津	0.3495	0.2688	0.3011	0.4032	0.3172	0.3333		0.7903	0.6183
北京	0.3720	0.2742	0.2742	0.3713	0.2688	0.2957	0.2097		0.6237
美国	0.5108	0.4274	0.5008	0.4839	0.4409	0.4785	0.3817	0.3763	

对角线以下为 Nei 的遗传距离, 对角线以上为遗传相似性系数。

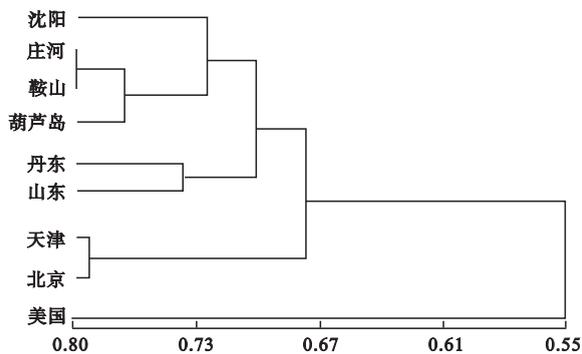


图 2 美国白蛾 9 个地理种群间的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 Nine geographic populations of *Hyphantria cunea* UPGMA cluster map

3 讨论

本试验使用优化的 RAPD 反应条件, 严格按照规范操作, 使用同 1 台 PCR 仪、同一家公司生产的 TaqDNA 聚合酶, 以提高 RAPD 反应的稳定性和重复性。

有关入侵物种适应性进化的遗传学基础研究, 对于认识外来入侵物种的适应性机制有重要意义。物种在不同环境和地理区域中的种群遗传分化可能是其适应不同环境的方式之一(Bush 2001 ;Reznick & Ghahambor 2001)。外来物种相对于原产地的基因变异可能预示了这个物种侵占新领地的潜力, 遗传多样性显著的外来物种在新的地区的潜在分布区域可能会大得多(邹宇萍和葛颂 2001)。随着分子生物学技术的发展, 尤其是聚合酶链式反应(PCR) 的出现, 分子遗传标记技术得到了迅猛发展, 在揭示物种的遗传变异和种群遗传关系研究中发挥着独特的优势。项卫东和张亚梅(2004)用 RAPD 标记技术对入侵我国 8 个种群的空心莲子草的遗传多样性及分化程度进行分析结合 UPGMA 聚类分析表明,

镇江和南京地区是空心莲子草遗传变异程度最高的中心区, 应该作为外来种空心莲子草防治及根除的重点地带。李钧敏等(2007)利用 ISSR 标记技术对入侵我国广东省的 8 个种群薇甘菊进行分析, 大部分遗传变异存在于种群内, 小部分变异存在于种群间, 具有较高的基因流, 为薇甘菊的生物防治提供了理论基础。

从 9 个不同地理种群美国白蛾总 DNA 多态位点百分率来看, 美国白蛾的遗传变异比较丰富, 达 82.72%, 其中辽宁省鞍山市种群的遗传变异程度最高, 应作为防治美国白蛾的重点区域。由图 2 可以看出, 国内 8 个群体的遗传相似性比较高 0.7957 ~ 0.6280, 首先聚在一起, 而与美国种群的相似性较低。从聚类图结果看, 辽宁省丹东市种群与山东省种群先聚类, 再与辽宁省其他 4 个地理种群聚类, 天津市与北京市种群先聚类后再与国内其他种群聚类, 最后国内 8 个种群与美国种群聚类。从地理位置上看天津市与北京市相邻且无地理隔离阻碍, 所以这 2 个地区种群聚为一类, 后与辽宁省、山东省种群聚类。1982 年山东省对美国白蛾的调查表明, 传入山东省的美国白蛾是由龙须公社渔民从东北疫区捎带木材, 于 1981 年传入并扩大繁殖(山东省 1982 年调查, 1983)。从聚类图看辽宁省丹东市种群与山东种群首先聚类与 1982 年的调查结果是一致的。

本研究表明, 美国白蛾种群间的遗传距离随地理距离逐渐增加, 初步推断地理距离和遗传距离存在一定的相关性。从聚类图中也可以看出美国白蛾种群间遗传距离与地理分布间的相关性。地理隔离可能是造成遗传距离与地理位置对应关系的原因。一是美国白蛾无迁飞习性, 飞翔能力不强, 其远距离的传播主要是借助交通工具, 地理隔离使得美国白蛾不同地理种群之间的基因交流减少, 对美国白蛾

的严格检疫使其随交通工具进行远距离传播的机会大大降低,减少了不同地理种群间的基因交流,造成不同地理种群间的遗传分化;二是人为干扰,如人工防治。美国白蛾是检疫性害虫各地区采取多种方式对其进行防治(杨忠岐和张永安,2007)与监控(余艾芳等,2008),使其生活环境发生了断层造成不同地理种群间的遗传分化。以上这些措施加大了不同地理种群间的隔离程度进而阻碍了种群间的基因交流,各地理种群间的基因交流减少导致国内不同地理种群美国白蛾间的遗传分化。

参考文献

- 成新跃,徐汝梅. 2007. 中国外来动物入侵概况. 生物学通报, **42**(9):1-4.
- 褚栋,陈国发,徐宝云,等. 2007. 烟粉虱 B 型和 Q 型群体遗传结构的 RAPD 分析. 昆虫学报, **50**(3):264-271.
- 傅建炜,陈小龙,尤民生. 2008. 黄曲跳甲种群分化的 RAPD 分析. 生态学杂志, **27**(12):2141-2145.
- 高德三. 1990. 检疫害虫美国白蛾在我国蚕区的传播及其防治措施. 蚕业科学, **16**(2):104-106.
- 季荣,谢宝瑜,李欣海,等. 2003. 外来入侵种——美国白蛾的研究进展. 昆虫知识, **4**(1):13-18.
- 金传玲. 1999. 预防美国白蛾传入的对策. 吉林林业科技, (3):52-54.
- 鞠珍,赵静,丁福波,等. 2008. 饥饿程度对美国白蛾生长发育和繁殖的影响. 昆虫知识, **45**(3):437-440.
- 亢雅娟. 2006. 生物入侵的途径. 太原市城市职业技术学院学报, **69**(4):136-137.
- 李钧敏,董鸣,钟章成. 2007. 入侵植物薇甘菊种群的遗传分化. 植物生态学报, **31**(4):680-688.
- 山东省 1982 年调查. 1983. 扑灭美国白蛾工作总结. 植物检疫, (3):3-4.
- 苏茂文,方宇凌,陶万强,等. 2008. 入侵害虫美国白蛾性信息素组分的鉴定和野外活性评估. 科学通报, **53**(2):191-196.
- 万方浩,郑小波,郭建英. 2005. 重要农林外来入侵物种的生物学与控制. 北京:科学出版社.
- 项卫东,张亚梅. 2004. 外来入侵种空心莲子草的 RAPD 遗传多样性分析. 南京林业大学学报(自然科学版), **28**(6):35-38.
- 杨效文,张孝曦,陈晓黄,等. 1999. 我国烟蚜种群分化的 RAPD 分析. 昆虫学报, **42**(1):372-380.
- 杨忠岐,张永安. 2007. 重大外来入侵害虫——美国白蛾生物防治技术研究. 昆虫知识, **44**(4):465-471.
- 印红,刘晓丽,王彦芳,等. 2002. 一种改进的昆虫基因组 DNA 的提取方法. 河北大学学报(自然科学版), **22**(1):80-83.
- 余艾芳,刘寰,张莉莉. 2008. 北京市美国白蛾虫害监测信息管理系统研建. 河北林果研究, **23**(1):37-39.
- 张德华,周开亚,孙红英. 2004. 乙醇保存的动物标本基因组 DNA 提取方法的比较. 生物杂志, **21**(6):46-48.
- 张四才,李正跃,肖春. 2006. 几种常用分子标记及其在昆虫学研究中的应用. 江西农业学报, **18**(4):66-71.
- 邹喻苹,葛颂. 2001. 系统与进化植物学中的分子标记. 北京:科学出版社.
- Bush RM. 2001. Predicting adaptive evolution. *Nature Reviews Genetics*, **2**:387-392.
- Reznick DN, Ghalambor CK. 2001. The population ecology of contemporary adaptations what empirical studies reveal about the conditions that promote adaptive evolution. *Genetica*, **112**:183-198.
- Umeya K, Itô Y. 1977. Invasion and establishment of a new insect pest in Japan// Hidaka T, ed. *Adaptation and Speciation in the Fall Webworm*. Tokyo:Kodansha:1-12.
- Warren LO, Tadic M. 1970. The fall webworm, *Hyphantria cunea* (Drury). *Agricultural Experiment Station*, 759:1-106.

作者简介 阚国仕,男,1979 年生,硕士研究生,副教授。主要从事酶工程及生物活性物质研究。E-mail:kanguoshi@163.com
责任编辑 刘丽娟
