

寄主胁迫下小菜蛾种群的 RAPD 分析^{*}

罗德 黄斌 侯有明^{**}

(福建农林大学植物保护学院 农业部亚热带农业生物灾害与治理重点开放实验室 福州 350002)

摘要 采用 RAPD-PCR 技术,研究了取食 6 种不同十字花科寄主植物第 4、9、15 代小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.) 种群的 DNA 多态性。通过 17 条引物的重复 PCR 扩增实验,利用 NTsys 软件对电泳条带统计分析,构建了遗传距离矩阵和聚类分析图谱。结果表明:取食芥蓝的小菜蛾种群与其它 5 种寄主种群遗传距离较远(0.6523~0.8246)独立聚为一枝;取食萝卜的小菜蛾种群遗传距离与甘蓝上种群较近(0.3443),聚为一枝,并且与白菜、芥菜和菜心上小菜蛾种群遗传距离较近,逐次聚为一枝,芥蓝、萝卜及甘蓝寄主种群随代次的增多种群分化出现稳定规律性。各寄主种群间遗传距离平均值和范围、多态性条带占总条带数目的比例随代次增多而增大,说明种群分化程度随代次增多而加深。

关键词 小菜蛾,寄主胁迫,种群变异,RAPD

Analysis of diamondback moth populations under host plants stress by RAPD

LUO De HUANG Bin HOU You-Ming^{**}

(College of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forestry University, Key Laboratory of Subtropical Agro-Biological Disasters and Management, Ministry of Agriculture, Fuzhou 350002, China)

Abstract DNA polymorphism of the fourth, ninth, and fifteen generations' of diamondback moth (DBM) *Plutella xylostella* (L.) populations, feeding on six different cruciferous host plants, was studied using the RAPD-PCR technique. After repeated DNA amplification with 17 primers, electrophoretic bands were statistically analyzed with NTsys software and a genetic distance matrix and dendrogram constructed. The results indicate that the population feeding on *Brassica alboglabra* Bailey clustered independently on one branch and was separated from the other five populations by the largest genetic distance (0.6523~0.8246). The populations feeding on *Raphanus sativus* L. and *B. oleracea* L. clustered on one branch and the genetic distance between these was small(0.3443). The genetic distance between populations feeding on *B. chinensis* L., *B. juncea* L. and *B. parachinensis* Bailey was also small and these populations also clustered on a single branch. With increasing generations the genetic differentiation of populations feeding on *B. juncea* L., *R. sativus* L. and *B. oleracea* L stabilized. As the generations increased, the average value, range of genetic distance between each host population and the proportion of polymorphic bands in the total number of bands enlarged. This shows that the level of population differentiation increases with generation.

Key words *Plutella xylostella*, host plants stress, population variation, RAPD

有关昆虫与寄主植物间的关系研究由来已久,Ehrlich 和 Raven(1964)和 Jermy(1976)认为植食性昆虫的进化受寄主植物因素的影响并解释了昆虫受寄主的影响而形成新种。杨效文等(1999)通过对不同寄主上烟蚜的研究表明,受寄主的影响,烟蚜存在寄主分化的现象。目前,普遍认为昆

虫的食性变化受寄主植物次生化学物质的影响,一方面,寄主植物利用次生物质,如生物碱、萜类化合物、酚类等防御、抑制昆虫的取食(赵卓等,2004;王琛柱和钦俊德,2007);另一方面,植物次生物质能诱导昆虫体内相关酶的变化,产生新的寄主适应能力(李云寿等,1996a,1996b,1997)。

* 资助项目:公益性行业(农业)科研专项(200803001)、国家自然科学基金(30671370)。

**通讯作者,E-mail: ymhou@fjau.edu.cn

收稿日期:2011-01-28,接受日期:2011-02-17

由于寄主理化性质、营养条件及次生代谢物质的影响,小菜蛾对寄主的选择性存在差异(Syed et al. 2002; 李洪山等,2006)。同时,不同寄主植物会对小菜蛾的生长发育、繁殖、体内各种酶的代谢水平产生差异性的影响(李云寿等,1996a,1996b,1997; 胡奇等,2006)。植物次生物质不参与植食性昆虫的生长发育和繁殖,但对昆虫的食性分化起了促进的作用。因此,在同一寄主选择压力下,从分子遗传水平上研究小菜蛾的寄主种群分化现象,有助于探讨寄主胁迫下小菜蛾暴发成灾的机理,为小菜蛾的综合治理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

供试虫源采自福建省福州市闽侯县荆溪镇蔬菜田,带回室内,在人工气候室稳定环境条件下饲养,寄主植物分别为6种供试十字花科蔬菜,环境条件为,温度:(27±1)℃,光照条件:2 000 lx,相对湿度:85%,光照周期L:D=14:10。在6种寄主植物上连续饲养小菜蛾至第15代,分别取第4、9及15代的小菜蛾4龄幼虫为DNA提取材料。

1.2 寄主植物

实验用菜为:萝卜 *Raphanus sativus* L.、菜心 *Brassica parachinensis* Bailey、芥菜 *B. juncea* L.、白菜 *B. chinensis* L.、芥蓝 *B. alboglabra* Bailey、甘蓝 *B. oleracea* L. (种子购自福州永荣种子公司)。上述6种十字花科蔬菜种子播种于塑料方塞内,盖上均匀土壤,放置于温室内,采取相同的水肥管理条件下培养,不施加任何化肥农药。

1.3 DNA 提取

取第4、9以及15代小菜蛾4龄幼虫,装入1.5 mL的离心管内,放置2 h后移入液氮内速冻。利用Insect gDNA kit试剂盒(BIOMIGA公司),提取这3代小菜蛾4龄幼虫DNA,每次提取6种供试样品的6头小菜蛾幼虫的DNA。

1.4 RAPD-PCR 扩增

随机引物参考程罗根等(2001)实验所使用的引物,筛选出多态性好的17条引物,引物目录见表1,并采用梯度PCR扩增反应引物调试的退火温度(TM值)。PCR反应为25 μL体系:10×Reaction Buffer加入2.5 μL,dNTP加入0.5 μL,Taq酶加入0.25 μL,模板DNA加入1 μL,引物加入1

μL,最后再加入灭菌的19.75 μL双蒸水。PCR扩增反应程序为:94℃ 5 min,93℃ 1 min,32/34℃ 1 min,72℃ 2 min,72℃ 7 min,循环40次。

1.5 琼脂糖凝胶电泳检测

RAPD-PCR扩增反应产物在2.0%的琼脂糖凝胶上电泳,电压为3 V/cm,时间3.5 h,核酸染料染色后,在凝胶成像系统内观察拍照。

1.6 数据处理

利用Excel2003对RAPD-PCR扩增产物电泳图进行统计,将含有扩增条带赋值为1,相反,赋值为0。统计各寄主种群的共有条带及差异性条带,计算出条带多态性指数。将编辑好的0/1矩阵的Excel表导入NTsys软件,构建遗传距离矩阵及遗传图谱。

表1 随机引物序号及碱基序列

Table 1 The number of random primers and the sequence of primers

| 引物序号 (No. of primers) | 碱基序列 (Sequence of primers) | 引物序号 (No. of primers) | 碱基序列 (Sequence of primers) |
|-----------------------------|----------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| 01 | ACGCCAGAGG | 10 | GGCGGTTGTC |
| 02 | GAGCGAGGCT | 11 | CCGTGACTCA |
| 03 | CAGGGGTGGA | 12 | GTCTTGGCGA |
| 04 | GGTCTGGTTG | 13 | GGGACGTTGG |
| 05 | ACGGGAGCAA | 14 | GGTGGTCAAG |
| 06 | CTCTGTTCCG | 15 | TCAGTCCGGG |
| 07 | GACTAGGTGG | 16 | CACCATCCGT |
| 08 | TGGCAAGGCA | 17 | CCGCTACCGA |
| 09 | GGGGGATGAG | | |

2 结果与分析

2.1 RAPD-PCR 多态性分析

从图1~3中可以看出,经17条随机引物PCR反应,第4、9、15代小菜蛾种群分别扩增出110、198、187条多态性条带,平均每条引物扩增的条带数分别为6.5、11.6、11条,并且条带清晰、明亮,基本没有拖带现象,说明17条引物扩增效果较好,可用于本实验研究。使用百泰克生物公司的100 bp DNALadder对3代小菜蛾种群扩增出条带标记,测出DNA条带分子量在200~1 500 bp之间。对扩增出的条带统计表明,3代试样的扩增条带中共有条带分别为12、18、16条,多态性条

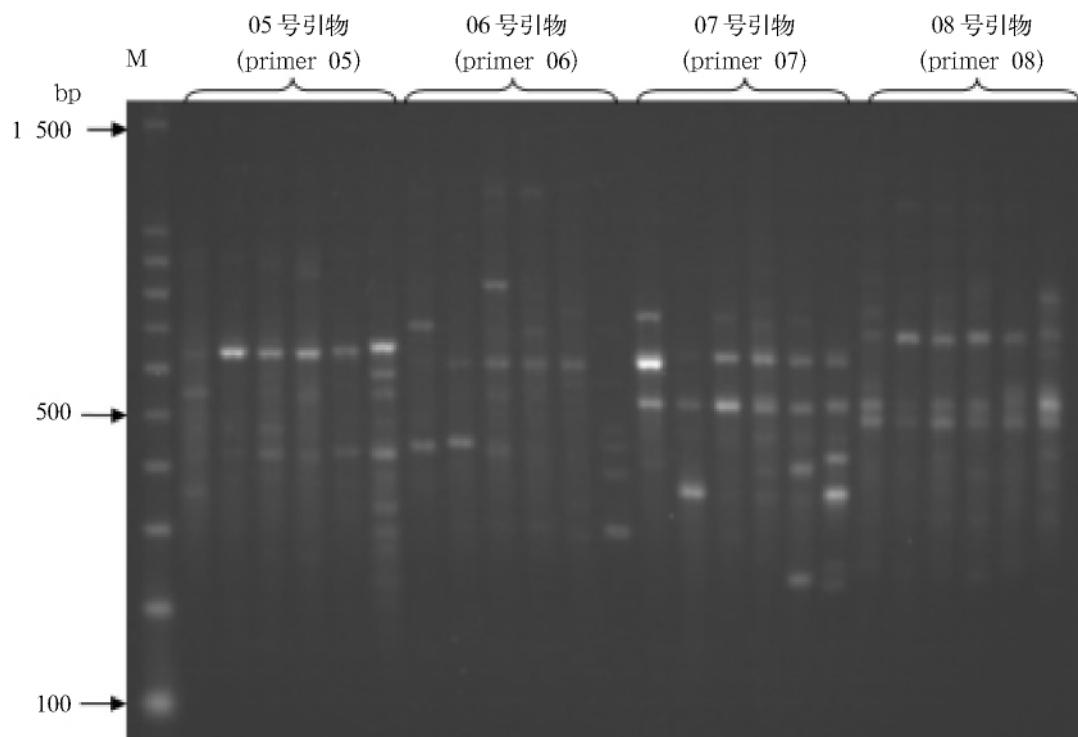


图1 随机引物 05、06、07、08 对取食不同寄主的第 4 代小菜蛾 PCR 结果

Fig. 1 The result of PCR for the 4th generation's diamondback moth feeding on different host plants with 05 , 06 , 07 , 08 primers

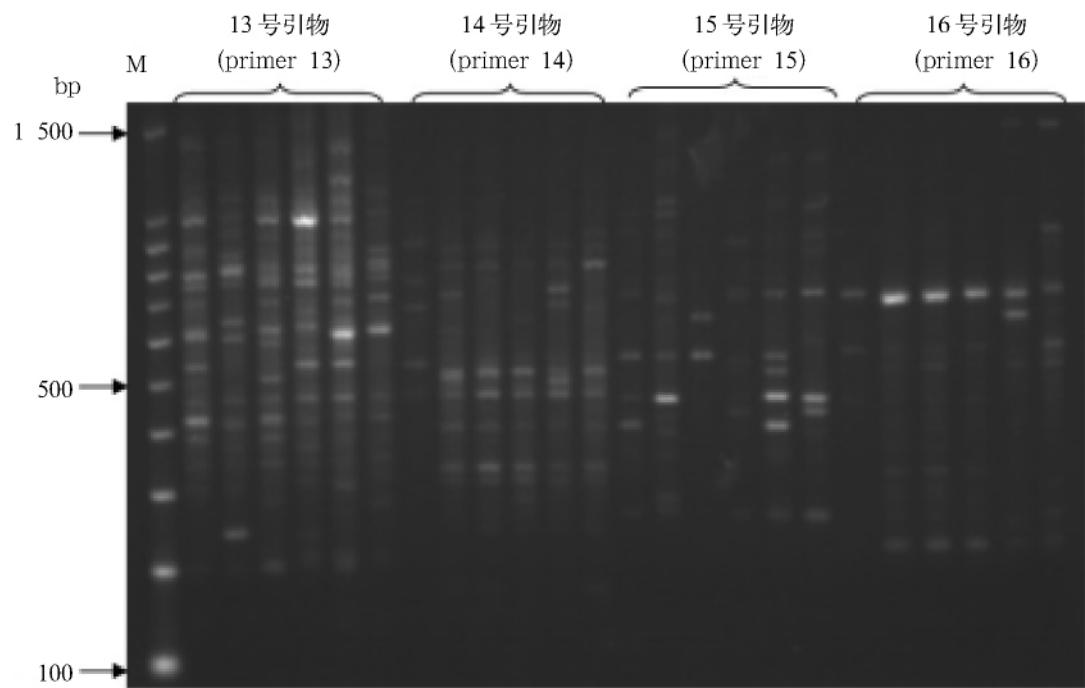


图2 随机引物 13、14、15、16 对取食不同寄主的第 9 代小菜蛾 PCR 结果

Fig. 2 The result of PCR for the 9th generation's diamondback moth feeding on different host plants with 13 , 14 , 15 , 16 primers

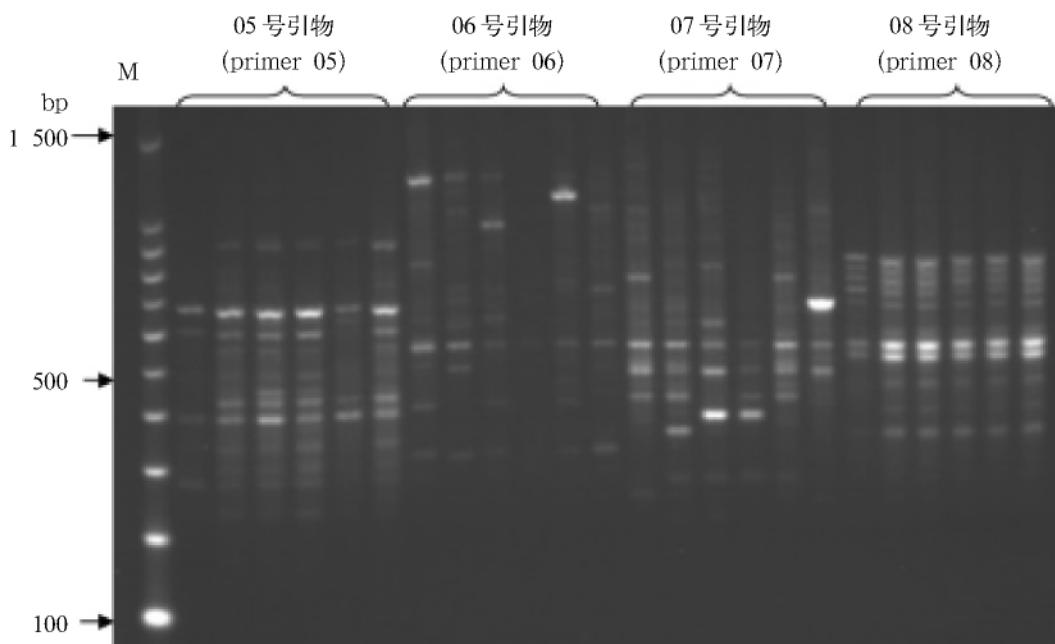


图 3 随机引物 05、06、07、08 对取食不同寄主的第 15 代小菜蛾种群 PCR 结果

Fig. 3 The result of PCR for the 15th generation's diamondback moth feeding on different host plants with 05, 06, 07, 08 primers

带分别为 98、180、171 条, 多态性条带占总带数的比例分别为 89.1%、90.1%、91.4%。

2.2 取食不同寄主的小菜蛾种群的遗传距离分析

用 NTsys 统计软件对取食不同寄主的小菜蛾第 4、9 及 15 代幼虫扩增结果进行处理, 构建遗传距离矩阵结果分别见表 2~4。

表 2 取食不同寄主植物的第 4 代小菜蛾遗传距离矩阵

Table 2 The genetic distance matrix of the 4th generation's diamondback moth feeding on different host plants

| | 芥蓝 (<i>Brassica alboglabra</i>) | 芥菜 (<i>Brassica juncea</i>) | 萝卜 (<i>Raphanus sativus</i>) | 甘蓝 (<i>Brassica oleracea</i>) | 菜心 (<i>Brassica parachinensis</i>) | 白菜 (<i>Brassica chinensis</i>) |
|--------------------------------------|--|--------------------------------------|---------------------------------------|--|---|---|
| 芥蓝 (<i>Brassica alboglabra</i>) | 0.0000 | | | | | |
| 芥菜 (<i>Brassica juncea</i>) | 0.5134 | 0.0000 | | | | |
| 萝卜 (<i>Raphanus sativus</i>) | 0.6671 | 0.3627 | 0.0000 | | | |
| 甘蓝 (<i>Brassica oleracea</i>) | 0.6711 | 0.6400 | 0.3278 | 0.0000 | | |
| 菜心 (<i>Brassica parachinensis</i>) | 0.6028 | 0.5195 | 0.4859 | 0.6130 | 0.0000 | |
| 白菜 (<i>Brassica chinensis</i>) | 0.5500 | 0.4708 | 0.5226 | 0.5577 | 0.4736 | 0.0000 |

对不同寄主植物上的小菜蛾第 4、9、15 种群的遗传距离处理可以看出, 各寄主种群间存在一定程度的遗传分化。第 4 代各寄主种群间的遗传距离范围在 0.3278~0.6711 之间。芥蓝寄主种群与其它 5 种寄主种群的遗传距离均在 0.5134 以上; 同时, 甘蓝寄主种群除与萝卜寄主种群遗传

距离较低外 (0.3278), 与其它 4 种寄主种群的遗传距离均在 0.5577 以上, 芥蓝与甘蓝寄主种群的遗传距离最大, 达 0.6711; 萝卜寄主种群除与芥蓝寄主种群遗传距离较大 (0.6671) 外, 与其它 4 种寄主种群遗传距离均较近。

表 3 取食不同寄主植物的第 9 代小菜蛾遗传距离矩阵

Table 3 The genetic distance matrix of the 9th generation's diamondback moth feeding on different host plants

| | 芥蓝 (<i>Brassica alboglabra</i>) | 芥菜 (<i>Brassica junccea</i>) | 萝卜 (<i>Raphanus sativus</i>) | 甘蓝 (<i>Brassica oleracea</i>) | 菜心 (<i>Brassica parachinensi</i>) | 白菜 (<i>Brassica chinensis</i>) |
|-------------------------------------|--|---------------------------------------|---------------------------------------|--|--|---|
| 芥蓝 (<i>Brassica alboglabra</i>) | 0.0000 | | | | | |
| 芥菜 (<i>Brassica junccea</i>) | 0.7662 | 0.0000 | | | | |
| 萝卜 (<i>Raphanus sativus</i>) | 0.6174 | 0.4596 | 0.0000 | | | |
| 甘蓝 (<i>Brassica oleracea</i>) | 0.6717 | 0.5129 | 0.4260 | 0.0000 | | |
| 菜心 (<i>Brassica parachinensi</i>) | 0.8300 | 0.6317 | 0.4413 | 0.4628 | 0.0000 | |
| 白菜 (<i>Brassica chinensis</i>) | 0.7458 | 0.4545 | 0.4957 | 0.5023 | 0.5346 | 0.0000 |

表 4 取食不同寄主植物的第 15 代小菜蛾遗传距离矩阵

Table 4 The genetic distance matrix of the 15th generation's diamondback moth feeding on different host plants

| | 芥蓝 (<i>Brassica alboglabra</i>) | 芥菜 (<i>Brassica junccea</i>) | 萝卜 (<i>Raphanus sativus</i>) | 甘蓝 (<i>Brassica oleracea</i>) | 菜心 (<i>Brassica parachinensi</i>) | 白菜 (<i>Brassica chinensis</i>) |
|-------------------------------------|--|---------------------------------------|---------------------------------------|--|--|---|
| 芥蓝 (<i>Brassica alboglabra</i>) | 0.0000 | | | | | |
| 芥菜 (<i>Brassica junccea</i>) | 0.7558 | 0.0000 | | | | |
| 萝卜 (<i>Raphanus sativus</i>) | 0.6523 | 0.3925 | 0.0000 | | | |
| 甘蓝 (<i>Brassica oleracea</i>) | 0.8264 | 0.5985 | 0.3443 | 0.0000 | | |
| 菜心 (<i>Brassica parachinensi</i>) | 0.7147 | 0.6450 | 0.5525 | 0.5614 | 0.0000 | |
| 白菜 (<i>Brassica chinensis</i>) | 0.6908 | 0.4642 | 0.3047 | 0.4501 | 0.4966 | 0.0000 |

不同寄主小菜蛾种群第 9 代的遗传距离范围在 0.4260 ~ 0.8300 之间。对芥蓝寄主种群与其它 5 种寄主种群的遗传距离考察发现,最小的遗传距离值为 0.6174,且与菜心寄主种群的遗传距离最大,说明与其它寄主种群的亲缘关系较远;对萝卜寄主种群的遗传距离比较发现,除与芥蓝寄主种群遗传距离较大外,与其它 4 种寄主种群遗传距离较小。

对第 15 代各寄主种群遗传距离分析可观察到,各寄主种群间的遗传距离范围为 0.3047 ~ 0.8264。芥蓝寄主种群与其它 5 种寄主种群的遗传距离最小值为 0.6523,远大于平均值,且比其它 5 种寄主种群间的遗传距离均大;萝卜寄主种群除与菜心、芥蓝寄主种群的遗传距离较大外,与其它 3 种寄主种群的遗传距离均为最小值。

2.3 不同寄主种群的遗传聚类分析

通过 NTsys 软件对各寄主种群间的 RAPD-PCR 电泳图片处理分析,构建聚类分析图见图 4 ~ 6。

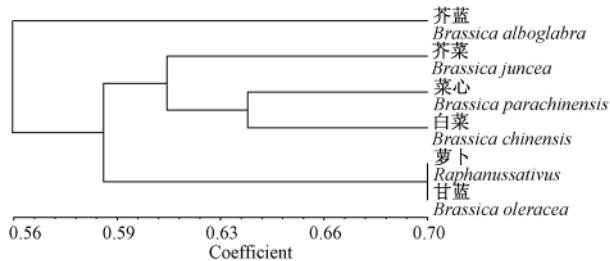


图 4 取食不同寄主植物小菜蛾第 4 代种群的遗传聚类图

Fig. 4 The genetic dendrogram of the 4th generation's diamondback moth feeding on different host plants

从取食不同寄主植物小菜蛾的第 4、9 及 15 代种群遗传聚类图可看出,芥蓝上小菜蛾种群与其它 5 种寄主小菜蛾种群的亲缘关系最远,经过 4 代的饲养,独立聚为一枝,并随代次的增多而逐渐累积,可说明芥蓝上小菜蛾种群与其它寄主上的小菜蛾种群遗传分化程度较大;萝卜上的小菜蛾种群与甘蓝上小菜蛾种群的亲缘关系最近,并聚

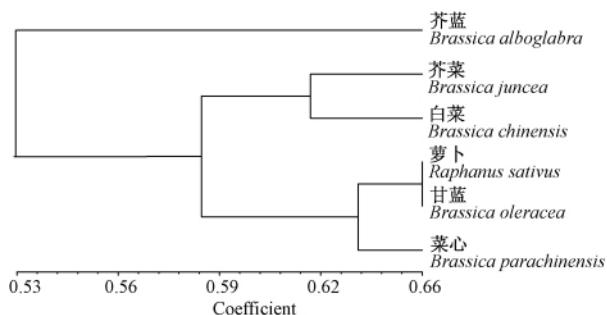


图5 取食不同寄主植物小菜蛾第9代种群的遗传聚类图
Fig. 5 The genetic dendrogram of the 9th generation's diamondback moth feeding on different host plants

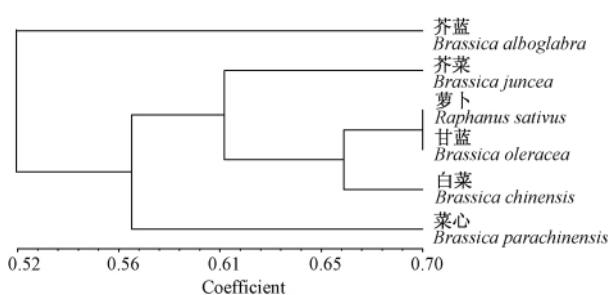


图6 取食不同寄主植物小菜蛾第15代种群的遗传聚类图
Fig. 6 The genetic dendrogram of the 15th generation's diamondback moth feeding on different host plants

为一枝,但在第4代时与芥蓝小菜蛾的亲缘关系较近。随着代次的增加,与芥蓝小菜蛾的亲缘关系逐渐加大,遗传分化趋于稳定;白菜、芥菜及菜心3个寄主上小菜蛾种群间的亲缘关系较近,但并未随饲养代次的增多而出现稳定的遗传分化规律。

3 讨论

从实验结果可以看出,多态性条带在总条带数的比例、各寄主种群间的遗传距离范围,随饲养代次的增多而增大,说明小菜蛾寄主种群分化程度随代次增多而扩大。芥蓝上小菜蛾种群从第4代开始,随饲养代次的增多,与其它寄主上小菜蛾种群间的遗传距离逐渐增大;各代次间,萝卜上小菜蛾种群与甘蓝上小菜蛾种群的遗传距离最近。根据Ayala(1974)对果蝇种群的遗传进化研究,对种以下阶元的遗传距离设立了一套标准,地方种群为0.031,端始种为0.226,亚种为0.230,同胞种为0.581,形态上不同的种为1.056。第4、9及15代这3代小菜蛾寄主种群寄主遗传距离范围为

0.3047~0.8300,发现各小菜蛾寄主种群的遗传分化水平在亚种与形态学上不同种之间,芥蓝上小菜蛾种群大多在同胞种和形态种之间。

通过对3代寄主种群遗传距离聚类分析图谱分析可看出,芥蓝上的第4代小菜蛾种群与其它5种寄主上的小菜蛾种群的亲缘关系较远,萝卜上小菜蛾种群与白菜上小菜蛾种群亲缘关系最近,并随代次的增多而趋于稳定,表明寄主植物诱导昆虫产生协同进化,随长期的食性选择压力而进化并可能形成寄主种群分化。有学者分别从寄主对棉蚜的形态指标、种群适合度及转换寄主后存活状态和分子遗传分化研究表明,生存在不同寄主植物的棉蚜存在寄主种群分化,并且转移寄主后虫体不能存活(龚鹏等2001;刘向东等2003),该结果与本文相同。6种十字花科寄主植物含有萝卜属的萝卜,芸苔属的芥蓝、芥菜、甘蓝、白菜及菜心。对小菜蛾取食6种寄主构建的遗传聚类图中可发现,萝卜上小菜蛾种群与甘蓝上小菜蛾种群遗传距离最短,并首先聚为一枝,并与芥菜、白菜、菜心、芥菜上小菜蛾种群亲缘关系较近,并随饲养代次的增多而趋于稳定,而同为芸苔属的芥蓝寄主种群与白菜、甘蓝、菜心、芥菜寄主种群的遗传距离较远。由此可见,不同种属的寄主植物对小菜蛾的影响并未出现种属差异性。

昆虫寄主分化涉及多方面的生态学和遗传学原因,是寄主植物与昆虫间的选择性、天敌作用、其它共生生物作用及抗药性综合长期进化的结果(刘向东等2004)。本文从遗传多样性上揭示了小菜蛾形成种群分化的动态趋势,但对于6种十字花科植物寄主如何及由何种因素诱导小菜蛾产生种群分化等问题是下一个研究课题的方向。

参考文献(References)

- Ayala FJ, Tracey ML, Hedgecock D, Richmond RC, 1974. Genetic differentiation during the speciation process in *Drosophila*. *Evolution*, 28:71—78.
程罗根,李凤良,韩招久,李忠英,陈之浩,2001.小菜蛾对杀虫双和杀螟丹抗药性遗传的DNA随机扩增多态性研究. *昆虫学报*, 44(1):15—20.
Ehrlich PR, Raven PH, 1964. Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution*, 18:586—608.
龚鹏,杨效文,张孝羲,刘向东,陈晓峰,2001.棉蚜(*Aphis gossypii*)种群寄主分化和季节分化的微卫星引物

- PCR 研究. 生态学报, 21(5):765—771.
- 胡奇, 常钰, 胡洋, 2006. 不同十字花科食物饲养的小菜蛾生长发育试验观察. 天津农业科学, 12(4):25—27.
- Jermy T, 1976. Insect-host plant relationships coevolution or sequential evolution? *Symp. Biol. Hung.*, 16:109—113.
- 李洪山, 王娟, 魏辉, 戴华国, 王俊华, 2006. 小菜蛾幼虫对不同寄主的取食嗜好性及其适宜性. 应用生态学报, 17(6):1065—1069.
- 李云寿, 罗万春, 慕立义, 赵善欢, 1996a. 不同寄主植物对小菜蛾艾氏剂环氧化酶和乙酰胆碱酯酶活性的影响. 植物保护学报, 23(2):182—184.
- 李云寿, 罗万春, 赵善欢, 1996b. 不同寄主植物对小菜蛾羧酸酯酶活性的影响. 山东农业大学学报, 27(2):147—151.
- 李云寿, 罗万春, 赵善欢, 1997. 取食不同寄主植物的小菜蛾酯酶同工酶的研究. 山东农业大学学报, 28(1):5—8.
- 刘向东, 翟保平, 张孝羲, 2003. 南京地区棉蚜寄主专化型及其成因研究. 中国农业科学, 36(1):54—58.
- 刘向东, 张孝羲, 翟保平, 2004. 蚜虫寄主专化型及其成因. 昆虫学报, 47(4):499—506.
- Syed TS, Abro GH, 陆永跃, 梁广文, 2002. 寄主植物对小菜蛾实验种群生物学参数的影响. 华南农业大学学报(自然科学版), 23(4):19—22.
- 王琛柱, 钦俊德, 2007. 昆虫与植物的协同进化: 寄主植物—铃夜蛾—寄生蜂相互作用. 昆虫知识, 44(3):311—319.
- 杨效文, 张孝羲, 陈晓峰, 王瑛, 1999. 不同寄主植物上烟蚜 DNA 多态性的 RAPD-PCR 分析. 植物保护学报, 26(2):147—152.
- 赵卓, 刘国东, 刘克文, 任炳忠, 2004. 昆虫与植物协同演化关系的研究概况. 吉林师范大学学报(自然科学版), 25(3):4—7.