

文章编号:1005—0906(2011)06—0108—04

不同化性亚洲玉米螟遗传多样性的 AFLP 分析

周淑香¹,鲁 新¹,刘宏伟¹,丁 岩¹,张国红¹,李丽娟¹,王瑞荣²

(1. 吉林省农业科学院植物保护研究所,吉林 公主岭 136100; 2. 吉林省桦甸市永吉街农业站,吉林 桦甸 132400)

摘 要: 从 50 对 AFLP 引物中筛选出 9 对多态性高、扩增稳定、重复性好的引物,对敦化一化型、洮南二化型和公主岭二化型 3 个地理种群共 24 个个体进行遗传多样性分析,研究不同化性亚洲玉米螟间的遗传关系。结果表明,9 对引物共扩增出 1 127 条清晰可辨的 DNA 条带,其中多态性条带 1 029 条,平均多态性比例为 91.30%;亚洲玉米螟不同种群个体间遗传相似性指数分布在 0.430 7~0.667 5 之间;同一种群内个体间的遗传相似性指数敦化一化型为 0.439 9~0.524 0,洮南二化型为 0.487 8~0.667 5,公主岭二化型为 0.459 7~0.563 9,遗传相似性较低,表明亚洲玉米螟遗传多样性十分丰富。聚类分析结果表明,供试的 24 个亚洲玉米螟聚成两大类,敦化一化型聚为一类,洮南二化型和公主岭二化型聚为一类。

关键词: 亚洲玉米螟; AFLP; 遗传多样性; 聚类分析

中图分类号: S435.131

文献标识码: A

Analysis on the Genetic Diversity of Different Voltinism Types Asian Corn Borer [*Ostrinia furnacalis* (Guenée)] by AFLP Markers

ZHOU Shu-xiang¹, LU Xin¹, LIU Hong-wei¹, WANG Rui-rong², et al.

(1. Institute of Plant Protection, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100;
2. Yongji Street Agricultural Station in Huadian city, Huadian 132400, China)

Abstract: For further understanding the population dynamics and improving the forecast and control of this species, the DNA polymorphism of 3 geographic populations and different voltinism types was analyzed by using amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique. The results showed that 1 127 bands were amplified with 9 pairs of primers and 1 029 polymorphic loci were found, which accounted for 91.30%. Genetic similarity coefficients of Asian corn borer individuals were changed from 0.430 7 to 0.667 5. By cluster analysis, twenty four accessions were grouped into two groups, Dunhua univoltine population is clustered in one group, Gongzhuling bivoltine and Taonan bivoltine populations are clustered in another group.

Key words: Asian corn borer; AFLP; Genetic diversity; Cluster analysis

亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Guenée) 属于鳞翅目 *Lepidoptera*, 螟蛾 *Pyralidae*, 秆野螟属

Ostrinia, 是世界性的玉米重要害虫。吉林省发生的亚洲玉米螟存在化性的差异^[1], 不同化性的亚洲玉米螟在虫体重量、繁殖力、抗寒性、复苏后发育历期、有效积温、成虫飞翔能力等方面存在显著差异, 并具有一定的遗传稳定性^[2~6]。鲁新等通过 RAPD 方法分析不同化性亚洲玉米螟之间的遗传差异, 把吉林省发生的亚洲玉米螟划分为一化型和二化型两种生态类型, 但未对其遗传多样性和遗传结构进行系统的分析^[7]。本研究采用 AFLP 分子标记技术

收稿日期: 2011-07-13

基金项目: 吉林省科技发展计划重大项目(20096025、20096029)、吉林省农业科学院博士启动基金

作者简介: 周淑香(1980-), 女, 助理研究员, 博士, 研究方向为农业病虫害生物防治, Tel: 0434-6283175

E-mail: df-200@yeah.net

鲁 新为本文通讯作者。E-mail: luxin58@163.com

对敦化一化型、洮南二化型和公主岭二化型 3 个地理种群共 24 个个体进行遗传多样性分析,了解亚洲玉米螟的遗传结构和遗传分化水平,为亚洲玉米螟综合防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

亚洲玉米螟于 2010 年 11 月在吉林省敦化、洮南和公主岭的玉米秸秆中采集越冬幼虫,带回实验室,放入光照培养箱内加温处理,以解除滞育,确定化性。选择敦化一化型、洮南二化型和公主岭二化型用于后续试验。

解除滞育条件为白天 28℃、夜间 22℃,光周期 16 h(光照):8 h(黑暗),温度变化与光周期同步。相对湿度 65%~75%,每周供水 1 次,每次 0.5 mL,直至化蛹。

1.2 基因组总 DNA 的提取

取单只成虫,去翅,加入液氮充分研磨,应用血液/细胞/基因组 DNA 提取试剂盒(天根公司)提取基因组 DNA(具体提取过程按照试剂盒说明书步骤进行操作)。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,检测合格后保存于-20℃备用

1.3 AFLP 实验方法

1.3.1 酶切连接

在 0.5 mL 离心管中加入模板 DNA(50 ng/ μ L)4 μ L,10 $\times$ Reaction buffer 2.5 μ L,EcoRI 接头(5 pmol/L)和 MseI 接头(50 pmol/L)各 1 μ L,EcoRI 4U,MseI 4U,10 mmol/L ATP 2.5 μ L,T4 连接酶(5 U/ μ L)1 μ L,补充 ddH₂O 至 25 μ L。混匀后离心 30 s,37℃温浴 5 h,8℃保温 4 h,4℃过夜。

1.3.2 预扩增

反应体系为 25 μ L,其中酶切连接产物 2 μ L,10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ L,dNTP(10 mmol/L)0.5 μ L,EcoRI 预扩引物 E01(10 mmol/L)1 μ L,MseI 预扩引物 M02(10 mmol/L)1 μ L,Taq 酶(2 U/ μ L)0.5 μ L,ddH₂O 18.5 μ L。反应程序为 94℃ 2 min;94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 80 s,共进行 30 个循环;72℃ 5 min。

1.3.3 选择性扩增

预扩产物 1:20 稀释后作为选扩模板,反应为 25 μ L 体系。其中预扩稀释样品 2 μ L,10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ L,dNTP 0.5 μ L,EcoRI 引物(5 ng/ μ L)1 μ L,MseI 引物(30 ng/ μ L)1 μ L,Taq 酶(2 U/ μ L)0.5 μ L,ddH₂O 17.5 μ L。反应程序为

94℃ 30 s,65℃ 30 s,72℃ 80 s;以后每循环温度递减 0.7℃,12 个循环;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 80 s,23 个循环。反应产物用 ABI377 测序仪进行检测。

表 1 AFLP 试验使用的接头及引物序列
Table 1 Sequences of adapter and primer used in AFLP

接头及扩增引物 Adapter and primer	序列 Sequence
EcoRI 接头 1	5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3'
EcoRI 接头 2	5'-AAT TGG TAC GCA GTC TAC-3'
MseI 接头 1	5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3'
MseI 接头 2	5'-TAC TCA GGA CTC AT-3'
E01	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CA-3'
M02	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A C-3'

1.4 数据分析

ABI377 测序仪电泳检测后的片段大小通过 GENESCAN 软件进分析,在原始数据的基础上,有带的地方替换为 1,无带的地方替换为 0。利用 NTSYS2.1 软件进行数据分析,得到相似系数矩阵。根据相似性系数绘制 UPG-MA 聚类图谱。

2 结果与分析

2.1 扩增结果与多态性分析

用筛选所得的 9 组引物组合对 3 个种群 24 头成虫 DNA 进行扩增,共得到 1 127 条可分辨的 DNA 条带。平均每组引物扩增出 125.5 条带,其中扩增带数最多的是引物 E-ACA/M-CTC 组合,为 145 条,最少的是引物 E-ACA/M-CTG,为 98 条。9 对引物共扩增出 1 029 条多态性条带,多态位点的比例平均为 91.30%(表 2)。9 组引物对在 3 个种群中扩增的多态性位点比例均在 90%以上,其中敦化一化型多态性位点比例为 93.88%;洮南二化型多态性位点比例为 93.95%;公主岭二化型为 94.42%(表 3)。多态性位点比例高表明亚洲玉米螟种群遗传多样性十分丰富。

对在一化性和二化性个体出现比例存在差异的位点做经过连续性矫正的样本频率的假设性检验,结果表明,所检验条带在不同化性个体中出现的比例差异不显著($\alpha=0.05$),未发现与化性相关的特异 DNA 条带。

表 2 9 对引物对 24 个样本的 AFLP 扩增结果
Table 2 Amplified results of 9 AFLP primer combinations

引物组合 Primer combination	样本数(个) Number	多态性带(条) Polymorphic bands	总带数(条) Total bands	多态性比例(%) Percent of polymorphic bands
E-AAG/M-CAA	24	108	124	86.78
E-ACA/M-CAA	24	124	138	89.85
E-ACA/M-CAG	24	123	134	91.79
E-ACA/M-CTC	24	135	145	93.11
E-ACA/M-CTG	24	91	98	92.86
E-ACC/M-CAA	24	112	122	91.80
E-ACC/M-CAG	24	120	131	91.60
E-ACC/M-CTA	24	122	132	92.42
E-ACC/M-CTG	24	97	106	91.51
总 计		1 029	1 127	91.30
平均值		125.5	114.7	91.30

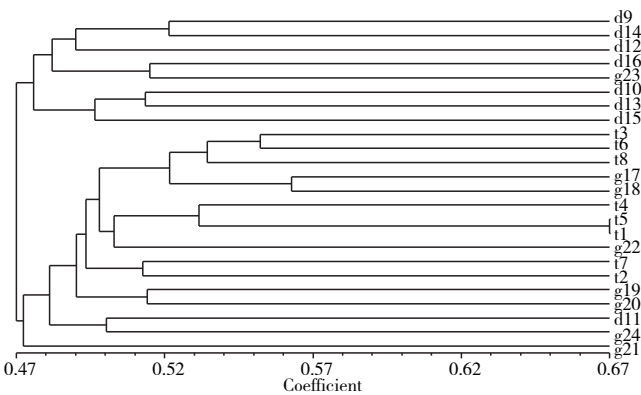
表 3 3 个种群 AFLP 扩增结果
Table 3 Amplified results of three *Ostrinia furnacalis* (Guenée) geographical populations

种 群 Population	样本数(个) Number	多态性带(条) Polymorphic bands	总带数(条) Total bands	多态性比例(%) Percent of polymorphic bands
敦化一化型	8	905	964	93.88
洮南二化型	8	994	1 058	93.95
公主岭二化型	8	998	1 057	94.42

2.2 相似性与聚类分析

所得的 24 头亚洲玉米螟个体之间的相似性系数分布在 0.430 7~0.667 5 之间,其中敦化一化型个体之间的相似性系数分布在 0.439 9~0.524 0 之间(平均 0.482 6±0.004 4);洮南二化型个体之间的相似性系数分布在 0.487 8~0.667 5 之间(平均 0.519 4±0.006 9);公主岭二化型个体之间的相似系指数分布在 0.459 7~0.563 9 之间(平均 0.491 6±0.004 3)。亚洲玉米螟种群内个体之间的遗传相似性较低,表明亚洲玉米螟在种群内部存在较高水平的遗传分化。

以个体间的相似性指数为依据,应用 UPGMA 法对 3 个亚洲玉米螟种群 24 个个体进行聚类分析,生成分子聚类分析树状图(图 1)。由图 1 可知,供试的 24 个亚洲玉米螟个体聚成两大类。其中敦化一化型(除 d11 外)聚为一类,还包括一个公主岭二化型个体 g23;公主岭二化型(除 g23 外)与洮南二化型聚为一类。



注:t 为洮南;d 为敦化;g 为公主岭。种群代码后的数字代表不同个体。
Note: The letters of t, d and g represented the population of Taonan, Dunhua, and Gongzhuling respectively. The number following the population code represented different individual.

图 1 亚洲玉米螟 3 个种群 24 个个体的 UPGMA 聚类关系图
Fig. 1 UPGMA dendrogram among three geographical populations of *Ostrinia furnacalis* (Guenée)

3 讨 论

实验结果显示,AFLP 指纹图谱共扩增出 1 127 条清晰可辨的 DNA 条带,其中多态性条带 1 029 条,平均多态性比例为 91.30%,说明 AFLP 技术是一种检测效率很高的分子标记技术,适用于亚洲玉米螟种群及其他昆虫遗传多样性的研究。

根据 9 组引物在 3 个种群中的检测结果,亚洲玉米螟种群的多态性位点比例较高,平均为 91.30%,个体间的遗传相似系数偏低,在 0.430 7~0.667 5 之间。表明亚洲玉米螟具有较丰富的遗传多样性,这可能是亚洲玉米螟对环境的适应能力较强、发生危害的范围广泛并且能够经常暴发成灾的主要原因^[8]。

应用 UPGMA 法对 3 个亚洲玉米螟种群 24 个个体进行聚类分析,生成的树状图显示,供试的 24 个亚洲玉米螟个体聚成两大类,其中敦化一化型(除 d11 外)聚为一类,洮南二化型和公主岭二化型(除 g23 外)聚为一类。与鲁新等利用 RAPD 得到的试验结果基本一致。

对在一化性和二化性个体出现比例存在差异的

位点做经过连续性矫正的样本频率的假设性检验,结果表明,所检验条带在不同化性个体中出现的比例差异不显著($\alpha=0.05$)。实验中未发现与化性相关的特异 DNA 条带。

参考文献:

- [1] 鲁 新,李建平,王蕴生. 亚洲玉米螟化性研究[J]. 玉米科学, 1995,3(2):75-78.
- [2] 鲁 新,周大荣,李建平. 亚洲玉米不同化性类型抗寒能力[J]. 玉米科学,1997,5(4):72-77.
- [3] 鲁 新,周大荣. 吉林省亚洲玉米螟化性类型与其发育历期的关系[J]. 植物保护学报,1999,26(1):1-6.
- [4] 鲁 新,周大荣. 亚洲玉米螟化性与繁殖力的关系[J]. 昆虫知识, 1999,36(2):74-77.
- [5] 鲁 新,周大荣. 亚洲玉米螟不同化性类型的光周期反应[J]. 植物保护学报, 2000,27(1):12-16.
- [6] 鲁 新,刘宏伟,汪洋洲,等. 亚洲玉米螟化型的主要特性及其遗传稳定性[J]. 植物保护学报,2009,36(2):183-184.
- [7] 鲁 新,周大荣. 亚洲玉米螟不同化性类型的 RAPD 分析[J]. 植物保护,1998,24(2):3-5.
- [8] 牛成伟,张青文,叶志华,等. 不同地区甜菜夜蛾种群的遗传多样性分析[J]. 昆虫学报,2006, 49(5): 867-873.

(责任编辑:李万良)