

基于 DNA 条形码对桃属植物上蚜虫的快速鉴定*

王哲¹ 景若芸² 乔格侠^{1**}

(1. 中国科学院动物进化与系统学重点实验室 北京 100101; 2. 陕西省西安市第八十三中学 西安 710043)

摘要 桃属(*Amygdalus*)植物是我国重要的果树,有些种类是常见的城市绿化观赏树种,也是多种蚜虫的寄主。蚜虫的体型小,有复杂的多型现象,传统的形态学特征往往无法实现对物种的准确而快速的鉴定。本研究应用 DNA 条形码技术,基于COI基因序列分析,对我国桃属植物上的蚜虫进行编码,为桃属植物上蚜虫的物种快速、准确鉴定提供有力的支持。本研究共编码桃属植物上蚜虫 12 种,其中蚜亚科 Aphidinae 6 属 10 种,毛管蚜亚科 Greenideinae 1 属 1 种,毛蚜亚科 Chaitophorinae 1 属 1 种。共获得COI基因序列 96 条,种内平均差异为 0.76%,种间为 5.7%~15.5%。基于COI序列构建了 NJ 树,绝大多数物种的样品有效地聚为一支,且支持率达到了 95% 以上。结合遗传距离和系统发育树分析表明,基于COI序列的 DNA 条形码能有效区分 99% 的桃属植物上的蚜虫物种。

关键词 蚜虫, DNA 条形码, COI, 桃属植物

Rapid identification of aphids on *Amygdalus* plants using DNA barcoding

WANG Zhe¹ JING Ruo-Yun² QIAO Ge-Xia^{1**}

(1. Key Laboratory of Zoological Systematics and Evolution, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 2. The 83th High School of Xi'an, Xi'an 710043, China)

Abstract *Amygdalus* plants are important fruit trees and some are common ornamental plants. They are also the host plants for a variety of aphids. It is difficult to identify aphids rapidly and accurately by traditional methods because of the degradation of specimens, specialization of morphological characters and the occurrence of multiple forms within species. In order to identify aphids rapidly and accurately, DNA barcoding based on COI sequences was used to analyze aphids on *Amygdalus* plants. In this study, 12 species were found, including 10 species from Aphidinae, 1 species from Greenideinae and 1 species from Chaitophorinae. 96 COI sequences were obtained from this study. The average intraspecific divergence was 0.76% while interspecific divergence was 5.7%-15.5%. NJ trees were built based on COI sequences, in which most samples of the same species clustered together with strong support (more than 95% bootstrap value). Combining sequence divergences and phylogenetic tree results, 99% of the aphid species on *Amygdalus* plants were well-differentiated by DNA barcoding.

Key words aphid, DNA barcoding, COI, *Amygdalus* plant

桃属(*Amygdalus*)属于蔷薇科 Rosaceae,全世界有 40 多种,分布于亚洲中部至地中海地区,栽培品种广泛分布于寒温带、暖温带至热带地区。我国有 12 种,分别是:扁桃(*A. communis*)、矮扁桃

(*A. nana*)、榆叶梅(*A. triloba*)、长梗扁桃(*A. pedunculata*)、西康扁桃(*A. tangutica*)、蒙古扁桃(*A. mongolica*)、桃(*A. persica*)、新疆桃(*A. ferganensis*)、山桃(*A. davidiana*)、陕西山桃(*A.*

* 资助项目:国家杰出青年基金(31025024);科技部基础工作专项(2011FY120200);国家自然科学基金委动物学特殊学科点(J1210002)和中国科学院动物进化与系统学重点实验室开放课题(O529YX5105)。

** 通讯作者, E-mail: qiaogx@ioz.ac.cn

收稿日期:2012-12-20,接受日期:2012-12-30

davidiana potanini)、甘肃桃 (*A. kansuensis*) 及光核桃 (*A. mira*) , 主要产于西部和西北部, 栽培种全国各地均有分布。

桃属植物是我国原产植物, 已有三千多年的栽培历史, 除了果树外, 还有很多优良的绿化树种。桃属植物上蚜虫种类很多, 其中一些种类是非常重要的农林业生产害虫, 例如: 甜菜蚜 *Aphis fabae*、棉蚜 *Aphis gossypii*、桃蚜 *Myzus persicae* 等。蚜虫危害桃树会造成叶片卷缩, 影响光合作用, 严重时叶片脱落, 影响产量与花芽形成, 削弱树木长势。蚜虫排泄的蜜露会污染叶面和枝梢, 使桃树生理作用受到阻滞, 常造成烟霉病, 加速早起落叶, 影响树木生长。

蚜虫体型很小, 形态特征特化或退化, 有效的分类形态特征比较少。蚜虫是昆虫中多型现象最为普遍的类群之一, 每个物种至少具有有翅孤雌型、无翅孤雌型 2 个型, 具有全周期生活史的蚜虫有 5 或 6 个型, 包括干母、干雌、有翅孤雌型、无翅孤雌型、性母、雌性蚜与雄性蚜。许多种蚜虫有不同的体色, 有时被误认为是不同的物种, 例如苹果蚜 *Aphis pomi* 的体色有黄、黄绿和绿等颜色变化。由于蚜虫形态的相似性和多态性, 依据形态特征的鉴定需要具有专业知识与丰富经验的分类学专家才能进行, 而且还要结合寄主植物等采集信息, 即便如此, 形态学的鉴定工作也相当困难, 重复描述与错误鉴定时有发生。

DNA 条形码 (DNA barcoding) 是通过对一个标准目的基因的 DNA 序列进行分析从而进行物种鉴定的技术。2003 年, 加拿大生物学家 Hebert 首次提出以线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I (cytochrome c oxidase subunit I, COI) 作为动物通用的物种鉴定标记 (Hebert *et al.*, 2003)。目前, DNA 条形码技术在许多动物类群中都得到了成功的应用, 同时也积累了大量的数据。在蚜虫物种鉴定方面, 也进行了很多尝试, 结果表明 COI 能够很好地区分大多数蚜虫物种 (Sabater-Munoz *et al.*, 2005; Foottit *et al.*, 2008; Wang and Qiao, 2009; Qiao *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011)。

本研究对中国分布的桃属植物上的 8 属 12 种蚜虫的 COI 序列进行扩增和分析, 以期对桃属植物上蚜虫物种的快速、准确鉴定提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

研究材料均来自于中国科学院动物研究所国家动物博物馆 (ZMCAS, 中国, 北京); 共计 96 号样品, 涉及 8 属 12 种 (样品信息见表 1)。所有标本浸泡于 75% 或 95% 酒精中, 95% 酒精浸泡标本用于分子实验, 75% 酒精浸泡标本用于制作玻片标本。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取、PCR 扩增和序列测定 采用改进的 CTAB 法提取单头蚜虫的基因组 DNA (Wang *et al.*, 2009)。

扩增及测序引物均选用通用引物 LEP-F (5'-ATT CAA CCA ATC ATA AAG ATA TTG G-3')、LEP-R (5'-AAA CTT CTG GAT GTC CAA AAA ATC A-3') (Foottit *et al.*, 2008)。PCR 扩增体系为 30 μL 体系, 包括: 3 μL 的 10 \times Buffer (+ Mg^{2+}), 2.4 μL 的 dNTPs (2.5 mmol/L), 21 μL 的 DDW, 0.4 μL 的 *Taq* DNA 聚合酶, 2 μL 的 DNA 模板, 正反引物各 0.6 μL 。扩增反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后送交北京蓝博斯特生物技术有限公司 ABI3730 测序仪进行双向测序。

1.2.2 序列分析和系统发育树的构建 使用 DNASTAR 软件包中的 Seqman 5.01 (DNASTAR, Inc. 1996) 拼接双向测序所得的正反向序列, 辅助以手工校对。并用 DNAMAN 5.2.2 (Lynnon Biosoft, Quebec, Canada) 软件检验拼接后的序列是否能正确翻译为蛋白质, 以确保序列的正确性。获得的所有序列用 MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011) 对序列进行多重比对。采用 Kumar-2P 模型计算同源序列间的遗传距离, 并以此距离构建 NJ 树, 检验支持率的重复性抽样分析 (bootstrap analysis) 次数为 1 000 次。

1.3 形态学鉴定

每号样品选取多头个体完整的无翅孤雌蚜制作成玻片标本, 在显微镜下进行形态学鉴定。所有标本的鉴定基于蚜虫主要的形态学鉴别特征, 并与相关联的已鉴定标本进行比较。名称与分类系统依据 Remaudière 和 Remaudière (1997) 的系统。

表 1 本研究所用样品信息

Table 1 Information for samples used in this study

| 属 Genus | 种 Species | 采集地点 Location | 采集日期 Date | 标本号 No. of ZMCAS | GenBank 登录号 GenBank accession no. |
|------------------------------------|------------------------------------|------------------|--------------|------------------------|--|
| 瘤头蚜属 <i>Tuberocephalus</i> Shinji | 桃瘤头蚜 <i>T. momonis</i> (Matsumura) | 贵州省遵义市 | 2010. 06. 05 | 24544 | KC286644 |
| | 桃瘤头蚜 <i>T. momonis</i> (Matsumura) | 四川省雅安市 | 2009. 05. 03 | 22534 | KC286645 |
| | 桃瘤头蚜 <i>T. momonis</i> (Matsumura) | 安徽省岳西县 | 2007. 08. 01 | 20264 | KC286646 |
| | 桃瘤头蚜 <i>T. momonis</i> (Matsumura) | 安徽省岳西县 | 2007. 07. 28 | 20246 | KC286647 |
| | 桃瘤头蚜 <i>T. momonis</i> (Matsumura) | 贵州省沿河县 | 2007. 06. 12 | 19752 | KC286648 |
| | 桃瘤头蚜 <i>T. momonis</i> (Matsumura) | 贵州省沿河县 | 2007. 06. 07 | 19703 | KC286649 |
| | 桃瘤头蚜 <i>T. momonis</i> (Matsumura) | 陕西省西安市 | 2006. 07. 19 | 19380 | KC286650 |
| | 桃瘤头蚜 <i>T. momonis</i> (Matsumura) | 四川省攀枝花市 | 2005. 04. 16 | 17156 | KC286651 |
| | 桃瘤头蚜 <i>T. momonis</i> (Matsumura) | 陕西省宁陕县 | 2005. 07. 03 | 16959 | KC286652 |
| | 桃瘤头蚜 <i>T. momonis</i> (Matsumura) | 新疆维吾尔自治区新源县 | 2005. 08. 01 | 16801 | KC286653 |
| | 桃瘤头蚜 <i>T. momonis</i> (Matsumura) | 北京市海淀区 | 2003. 06. 15 | 14250 | JX844360 |
| | 桃瘤头蚜 <i>T. momonis</i> (Matsumura) | 北京市海淀区 | 2003. 05. 18 | 14234 | JX844362 |
| | 桃瘤头蚜 <i>T. momonis</i> (Matsumura) | 北京市密云县 | 2009. 07. 20 | 23398 | JX844408 |
| | 桃瘤头蚜 <i>T. momonis</i> (Matsumura) | 北京市丰台区 | 2003. 06. 28 | 14322 | KC286654 |
| | 桃瘤头蚜 <i>T. momonis</i> (Matsumura) | 新疆维吾尔自治区乌什县 | 2005. 07. 26 | 16855 | KC286655 |
| | 桃瘤头蚜 <i>T. momonis</i> (Matsumura) | 吉林省延吉市 | 2005. 07. 24 | 17618 | KC286656 |
| | 桃瘤头蚜 <i>T. momonis</i> (Matsumura) | 宁夏回族自治区泾源县 | 2008. 06. 01 | 21105 | KC286657 |
| | 桃瘤头蚜 <i>T. momonis</i> (Matsumura) | 宁夏回族自治区泾源县 | 2008. 07. 05 | 21606 | KC286658 |
| | 桃瘤头蚜 <i>T. momonis</i> (Matsumura) | 宁夏回族自治区泾源县 | 2008. 07. 07 | 21690 | KC286659 |
| | 桃瘤头蚜 <i>T. momonis</i> (Matsumura) | 吉林省延吉市 | 2009. 06. 28 | 22372 | KC286660 |
| 桃瘤头蚜 <i>T. momonis</i> (Matsumura) | 甘肃省文县 | 2009. 05. 29 | 23006 | KC286661 | |
| 瘤蚜属 <i>Myzus</i> Passerini | 桃蚜 <i>M. persicae</i> (Sulzer) | 北京市海淀区 | 2004. 04. 21 | 13455 | KC286663 |
| | 桃蚜 <i>M. persicae</i> (Sulzer) | 新疆维吾尔自治区皮山县 | 2002. 09. 25 | 13995 | KC286664 |
| | 桃蚜 <i>M. persicae</i> (Sulzer) | 河北省东光县 | 2005. 05. 02 | 16122 | KC286665 |
| | 桃蚜 <i>M. persicae</i> (Sulzer) | 北京市海淀区 | 2006. 04. 25 | 16542 | KC286666 |
| | 桃蚜 <i>M. persicae</i> (Sulzer) | 北京市海淀区 | 2006. 04. 29 | 16549 | JX844381 |
| | 桃蚜 <i>M. persicae</i> (Sulzer) | 北京市海淀区 | 2010. 05. 16 | 24385 | JX844413 |
| | 桃蚜 <i>M. persicae</i> (Sulzer) | 新疆维吾尔自治区若羌县 | 2002. 09. 30 | 14027 | KC286667 |
| | 黄药子瘤蚜 <i>M. varians</i> Davidson | 北京市海淀区 | 2003. 06. 15 | 14256 | JX844368 |
| | 黄药子瘤蚜 <i>M. varians</i> Davidson | 北京市海淀区 | 2003. 06. 15 | 14257 | JX844369 |
| | 黄药子瘤蚜 <i>M. varians</i> Davidson | 宁夏回族自治区泾源县 | 2008. 07. 06 | 21194 | KC286676 |
| | 黄药子瘤蚜 <i>M. varians</i> Davidson | 福建省武夷山保护区 | 2004. 05. 17 | 14703 | KC286677 |
| | 黄药子瘤蚜 <i>M. varians</i> Davidson | 福建省武夷山保护区 | 2004. 05. 23 | 14783 | KC286678 |
| | 黄药子瘤蚜 <i>M. varians</i> Davidson | 福建省武夷山保护区 | 2004. 05. 23 | 14784 | KC286679 |
| | 黄药子瘤蚜 <i>M. varians</i> Davidson | 福建省武夷山保护区 | 2004. 05. 23 | 14785 | KC286680 |
| | 黄药子瘤蚜 <i>M. varians</i> Davidson | 福建省武夷山保护区 | 2004. 05. 26 | 14839 | KC286681 |

续表 1 (Table 1 continued)

| 属 Genus | 种 Species | 采集地点 Location | 采集日期 Date | 标本号 No. of ZMCAS | GenBank 登录号 GenBank accession no. |
|---------------------------------------|--|------------------|--------------|------------------------|--|
| | 黄药子瘤蚜 <i>M. varians</i> Davidson | 西藏自治区察隅县 | 2005. 07. 14 | 16432 | KC286682 |
| | 黄药子瘤蚜 <i>M. varians</i> Davidson | 四川省米易县 | 2005. 04. 19 | 17164 | KC286683 |
| | 黄药子瘤蚜 <i>M. varians</i> Davidson | 广西壮族自治区兴安市 | 2006. 05. 27 | 18978 | KC286684 |
| | 黄药子瘤蚜 <i>M. varians</i> Davidson | 四川省雅安市 | 2009. 05. 13 | 22535 | KC286685 |
| | 黄药子瘤蚜 <i>M. varians</i> Davidson | 甘肃省文县 | 2009. 05. 29 | 23012 | KC286686 |
| | 黄药子瘤蚜 <i>M. varians</i> Davidson | 广西壮族自治区桂林市 | 2011. 06. 08 | 25723 | KC286687 |
| | 黄药子瘤蚜 <i>M. varians</i> Davidson | 浙江省安吉县 | 2011. 05. 28 | 26724 | KC286688 |
| | 黄药子瘤蚜 <i>M. varians</i> Davidson | 福建省武夷山市 | 2011. 06. 12 | 26872 | KC286689 |
| | 杏瘤蚜 <i>M. mumecola</i> (Matsumura) | 宁夏回族自治区泾源县 | 2008. 06. 30 | 21160 | KC286662 |
| 短尾蚜属 <i>Brachycaudus</i> van der Goot | 李短尾蚜 <i>B. helichrysi</i> (Kaltenbach) | 北京市朝阳区 | 2010. 05. 03 | 24377 | JX844411 |
| | 李短尾蚜 <i>B. helichrysi</i> (Kaltenbach) | 内蒙古自治区呼和浩特市 | 2012. 05. 20 | 27602 | KC286668 |
| | 李短尾蚜 <i>B. helichrysi</i> (Kaltenbach) | 内蒙古自治区呼和浩特市 | 2012. 05. 20 | 27609 | KC286669 |
| | 李短尾蚜 <i>B. helichrysi</i> (Kaltenbach) | 北京市昌平区 | 2010. 05. 08 | 24408 | KC286670 |
| | 李短尾蚜 <i>B. helichrysi</i> (Kaltenbach) | 四川省盐边县 | 2005. 04. 03 | 17073 | KC286671 |
| | 李短尾蚜 <i>B. helichrysi</i> (Kaltenbach) | 四川省盐源县 | 2005. 04. 28 | 17215 | KC286672 |
| | 李短尾蚜 <i>B. helichrysi</i> (Kaltenbach) | 云南省丽江县 | 2006. 04. 27 | 18226 | KC286673 |
| | 李短尾蚜 <i>B. helichrysi</i> (Kaltenbach) | 四川省雅江县 | 2009. 05. 27 | 22640 | KC286674 |
| | 李短尾蚜 <i>B. helichrysi</i> (Kaltenbach) | 四川省雅江县 | 2009. 05. 29 | 22657 | KC286675 |
| 大尾蚜属 <i>Hyalopterus</i> Koch | 桃粉大尾蚜 <i>H. pruni</i> (Geoffroy) | 河南省郑州市 | 2010. 05. 09 | 24361 | KC286696 |
| | 桃粉大尾蚜 <i>H. pruni</i> (Geoffroy) | 甘肃省陇南市 | 2009. 05. 28 | 22993 | KC286697 |
| | 桃粉大尾蚜 <i>H. pruni</i> (Geoffroy) | 北京市朝阳区 | 2012. 05. 18 | 27531 | KC286695 |
| | 桃粉大尾蚜 <i>H. pruni</i> (Geoffroy) | 北京市海淀区 | 2009. 06. 14 | 23263 | JX844406 |
| | 桃粉大尾蚜 <i>H. pruni</i> (Geoffroy) | 山东省日照市 | 2007. 04. 21 | 19554 | KC286694 |
| | 桃粉大尾蚜 <i>H. pruni</i> (Geoffroy) | 甘肃省文县 | 2004. 05. 30 | 19198 | KC286693 |
| | 桃粉大尾蚜 <i>H. pruni</i> (Geoffroy) | 江苏省南京市 | 2006. 06. 02 | 19186 | KC286692 |
| | 桃粉大尾蚜 <i>H. pruni</i> (Geoffroy) | 北京市海淀区 | 2004. 05. 15 | 13474 | KC286691 |
| | 桃粉大尾蚜 <i>H. pruni</i> (Geoffroy) | 广东省乳源县 | 2006. 04. 11 | 18589 | KC286690 |
| | 桃粉大尾蚜 <i>H. pruni</i> (Geoffroy) | 福建省武夷山保护区 | 2004. 05. 16 | 14721 | KC286698 |
| | 桃粉大尾蚜 <i>H. pruni</i> (Geoffroy) | 福建省武夷山保护区 | 2004. 05. 23 | 14782 | KC286699 |
| | 桃粉大尾蚜 <i>H. pruni</i> (Geoffroy) | 海南省五指山保护区 | 2008. 04. 02 | 20971 | KC286700 |
| | 桃粉大尾蚜 <i>H. pruni</i> (Geoffroy) | 广西壮族自治区隆安县 | 2010. 11. 13 | 26171 | KC286701 |
| | 桃粉大尾蚜 <i>H. pruni</i> (Geoffroy) | 北京市海淀区 | 2006. 05. 14 | 18846 | JX844389 |
| | 桃粉大尾蚜 <i>H. pruni</i> (Geoffroy) | 北京市昌平区 | 2010. 06. 05 | 24647 | JX844422 |
| | 桃粉大尾蚜 <i>H. pruni</i> (Geoffroy) | 陕西省靖边县 | 2012. 06. 08 | 28102 | KC286702 |
| | 桃粉大尾蚜 <i>H. pruni</i> (Geoffroy) | 北京市海淀区 | 2004. 05. 10 | 13470 | KC286703 |
| | 桃粉大尾蚜 <i>H. pruni</i> (Geoffroy) | 新疆维吾尔自治区若羌县 | 2002. 09. 30 | 14028 | KC286704 |
| | 桃粉大尾蚜 <i>H. pruni</i> (Geoffroy) | 北京市海淀区 | 2003. 05. 18 | 14233 | JX844361 |

续表 1 (Table 1 continued)

| 属 Genus | 种 Species | 采集地点 Location | 采集日期 Date | 标本号 No. of ZMCAS | GenBank 登录号 GenBank accession no. |
|---|--|------------------|--------------|------------------------|--|
| | 桃粉大尾蚜 <i>H. pruni</i> (Geoffroy) | 北京市海淀区 | 2006. 06. 15 | 14249 | JX844365 |
| | 桃粉大尾蚜 <i>H. pruni</i> (Geoffroy) | 北京市海淀区 | 2003. 06. 23 | 14297 | KC286705 |
| | 桃粉大尾蚜 <i>H. pruni</i> (Geoffroy) | 北京市海淀区 | 2003. 06. 23 | 14298 | JX844371 |
| | 桃粉大尾蚜 <i>H. pruni</i> (Geoffroy) | 北京市海淀区 | 2005. 04. 30 | 16115 | KC286706 |
| | 桃粉大尾蚜 <i>H. pruni</i> (Geoffroy) | 北京市海淀区 | 2005. 05. 07 | 16144 | KC286707 |
| | 桃粉大尾蚜 <i>H. pruni</i> (Geoffroy) | 北京市海淀区 | 2006. 05. 04 | 16558 | JX844383 |
| | 桃粉大尾蚜 <i>H. pruni</i> (Geoffroy) | 陕西镇安县 | 2005. 05. 07 | 16935 | KC286708 |
| | 桃粉大尾蚜 <i>H. pruni</i> (Geoffroy) | 陕西宁陕县 | 2005. 07. 01 | 16997 | KC286709 |
| | 桃粉大尾蚜 <i>H. pruni</i> (Geoffroy) | 北京市海淀区 | 2006. 06. 08 | 19313 | JX844395 |
| | 桃粉大尾蚜 <i>H. pruni</i> (Geoffroy) | 北京市房山区 | 2007. 07. 05 | 19784 | JX844397 |
| | 桃粉大尾蚜 <i>H. pruni</i> (Geoffroy) | 新疆自治区昌吉县 | 2007. 07. 18 | 20571 | KC286710 |
| | 桃粉大尾蚜 <i>H. pruni</i> (Geoffroy) | 北京市朝阳区 | 2010. 05. 16 | 24389 | KC286711 |
| | 桃粉大尾蚜 <i>H. pruni</i> (Geoffroy) | 陕西省西安市 | 2010. 06. 02 | 25003 | KC286712 |
| | 桃粉大尾蚜 <i>H. pruni</i> (Geoffroy) | 北京市朝阳区 | 2012. 05. 08 | 27533 | KC286713 |
| | 桃粉大尾蚜 <i>H. pruni</i> (Geoffroy) | 北京市延庆县 | 2005. 05. 12 | 16154 | KC286714 |
| | 桃粉大尾蚜 <i>H. pruni</i> (Geoffroy) | 西藏自治区林芝县 | 2003. 08. 21 | 15418 | KC286715 |
| 缢管蚜属 <i>Rhopalosiphum</i> Koch | 禾谷缢管蚜 <i>R. Padi</i> (Linnaeus) | 北京市朝阳区 | 2010. 05. 04 | 24378 | JX844412 |
| | 禾谷缢管蚜 <i>R. Padi</i> (Linnaeus) | 内蒙古自治区呼和 浩特市 | 2011. 09. 29 | 27414 | KC286717 |
| | 红腹缢管蚜 <i>R. rufiabdominalis</i> Sasaki | 广西自治区上思县 | 2010. 11. 19 | 26267 | KC286718 |
| 圆瘤蚜属 <i>Ovatus</i> van der Goot | 苹果瘤蚜 <i>O. malisuctus</i> (Matsumura) | 四川省成都市 | 2009. 05. 12 | 22510 | KC286716 |
| 高蚜属 <i>Elatobium</i> van der Hoeven | 柳高蚜 <i>E. salicifoliae</i> Zhang | 西藏自治区林芝地 区 | 2010. 08. 03 | 25750 | KC286721 |
| 多态毛蚜属 <i>Periphyllus</i> Mordvilko | 栾多态毛蚜 <i>P. koelreuteriae</i> (Takahashi) | 北京市朝阳区 | 2009. 04. 21 | 22199 | KC286720 |
| 声毛管蚜属 <i>Mollitrichosiphum</i> Suenaga | 芦川声毛管蚜 <i>M. luchuanum</i> (Takahashi) | 福建省武夷山保护 区 | 2003. 07. 14 | 14488 | KC286719 |

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增效率以及基因片段序列分析

实验结果表明,通用引物 LEP-F/R 能够在比较宽泛的退火温度范围(46 ~ 52℃)内成功扩增桃属植物上蚜虫的 COI 基因序列,扩增效率达到 100%,完全符合作为 DNA 条形码的要求。本研究共获得 COI 序列共 96 条,经 Seqman 比对后得到 667 bp 用于后续的研究。

其中保守位点 468 个,可变位点 199 个,简约信息位点 164 个。碱基平均含量为 41.2% T、14.0% C、34.4% A、10.4% G。A + T = 75.6%, C + G = 24.4%,存在明显的 A、T 偏向性。

2.2 系统发育树结构分析

基于邻接法和最大简约法分别构建了 NJ 树(图 1),结合系统发育树与形态鉴定的结果,共鉴定出桃属植物上蚜虫 12 种,分属于 3 个亚科,即蚜亚科 Aphidinae (10 种)、毛管蚜亚科 Greenideinae (1 种)和毛蚜亚科 Chaitophorinae (1 种)。

从系统发育树中可以看出,除杏瘤蚜 *M. mumecola* 与桃蚜 *M. persicae* 混杂在一起,其他各物种的样品都有效的聚成单系,只具一个样品物种也与其他物种明显的分开。长管蚜族 Macrosiphini 的物种,桃瘤头蚜 *T. momonis*、杏瘤蚜 *M. mumecola*、桃蚜 *M. persicae*、黄药子瘤蚜 *M.*

varians、苹果瘤蚜 *O. malisuctus*、李短尾蚜 *B. helichrysi* 聚成单系,支持率为 75%。但瘤蚜属 *Myzus* 的物种并没有聚成单系。蚜亚科的物种聚成单系与毛管蚜亚科和毛蚜亚科分开。且在分支树的端部,各聚在一起的物种的支持率都很高,为 99% ~ 100%。

2.3 序列差异分析

基于 K2P 模型,选取每个物种至少 2 号样品

的 6 个物种,计算物种的平均种内遗传距离(表 2),以及 12 个物种的种间遗传距离(表 3)。种内遗传距离最小值为 0.06%,最大值为 1.7%。种间遗传距离的结果可以看出,除了桃蚜与杏瘤蚜的遗传距离为 0.3% 以外,其余两两物种的种间遗传距离均大于 5.7%,最大种间遗传距离达到了 15.5%。

表 2 各种种内序列差异

Table 2 Mean and range of intraspecific nucleotide divergences

| 物种 Species | 样品数 No. of individuals | 平均差异 (%) Mean divergence (%) | 范围 (%) Range (%) |
|-------------------------------------|---------------------------|---------------------------------|---------------------|
| 桃瘤头蚜 <i>Tuberocephalus momonis</i> | 21 | 0.10 | 0 - 0.30 |
| 黄药子瘤蚜 <i>Myzus varians</i> | 16 | 0.06 | 0 - 0.18 |
| 李短尾蚜 <i>Brachycaudus helichrysi</i> | 9 | 1.60 | 0 - 2.60 |
| 禾谷缢管蚜 <i>Rhopalosiphum padi</i> | 2 | 1.68 | — |
| 桃粉大尾蚜 <i>Hyalopterus pruni</i> | 35 | 1.00 | 0 - 2.30 |
| 桃蚜 <i>Myzus persicae</i> | 7 | 0.10 | 0 - 0.30 |

3 讨论

3.1 COI 作为 DNA 条形码对桃属植物上蚜虫的鉴定效力

以距离法为基础条形码技术 (distance-based barcoding) 能否准确的鉴定出物种依赖于所选分子标记的物种种间遗传距离和种内遗传距离之间的分离程度 (Aliabadian *et al.*, 2009)。当种间和种内的遗传距离没有重叠时,物种就比较容易和准确的被鉴定。在桃属植物上的蚜虫中,基于 COI 序列的距离分析表明种内与种间距离几乎没有重叠(图 2),种内平均差异为 0.76%,种间序列平均差异为 11.1%。除了杏瘤蚜与桃蚜,大多数物种都能有效的被区分,鉴定效率达到 99%。说明 COI 基因作为 DNA 条形码区分蚜虫物种是可行的,这个结果与 Footit 等 (2008) 和 Lee 等 (2011) 的研究非常相似。

3.2 基于 COI 基因的 DNA 条形码研究有助于发现物种的谱系地理结构

从 NJ 树上可以看出,一些广布物种已经呈现出一定的谱系地理结构分化,例如李短尾蚜的北方(北京、内蒙古)种群和南方(四川、云南)种群

的分化就非常明显,南北方分支的支持率分别达到了 80% 和 98%,遗传距离的差异达到了 2.5%。黄药子瘤蚜的情况与李短尾蚜类似,南方种群与北方种群分化明显,遗传距离的差异达到了 1.8%。但桃瘤头蚜和柳二尾蚜这两个广布物种的 COI 基因却没有发生明显的地理分化。因此,对于 COI 基因的分析,将为研究物种的谱系地理结构以及物种形成提供更多的信息。

3.3 基于 COI 基因的 DNA 条形码研究有助于发现物种的同物异名现象

在 NJ 树上,杏瘤蚜与桃蚜混杂在一起。这两个物种间的遗传距离只有 0.3%,桃蚜的种内遗传距离为 0 ~ 0.30%,两者之间存在着重叠。杏瘤蚜与桃蚜这两个物种在形态上也非常相似,区别在于杏瘤蚜的头部背面有微刺分布,头顶毛长等于或几乎等于触角节 III 的中宽,桃蚜的头部背面至少中域光滑,头顶毛长至多为触角节 III 中宽的 2/3 (乔格侠等, 2009)。鉴于形态和分子数据,可以推断杏瘤蚜与桃蚜的物种界定存在一定问题,可能存在同物异名现象。由于本研究杏瘤蚜的样品只有 1 号,还需要增加分子数据的样品量,并结合形态学、生物学等信息来加以验证。

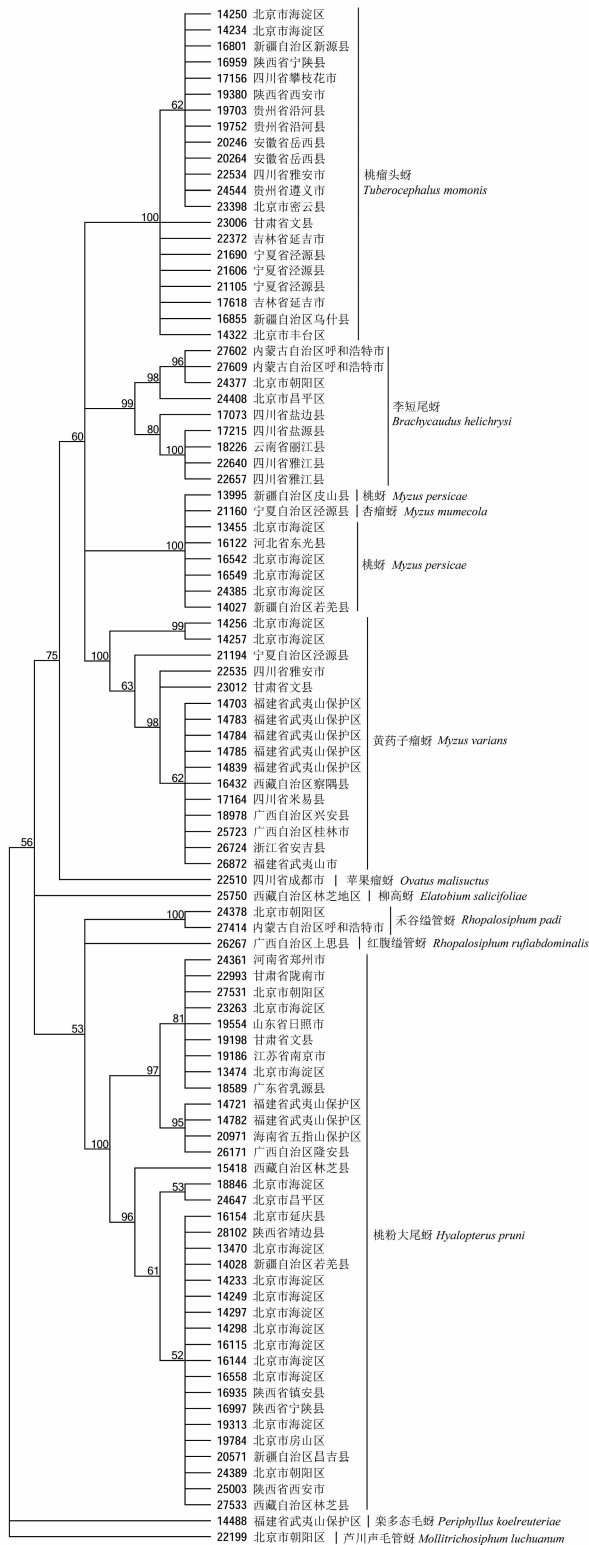


图 1 基于 COI 序列和 K2P 模型构建的 NJ 树,自举检验支持率标在分支左侧

Fig. 1 Neighbour-Joining (NJ) tree based on COI sequences and Kimura's two parameter model with bootstrap percentages shown on left

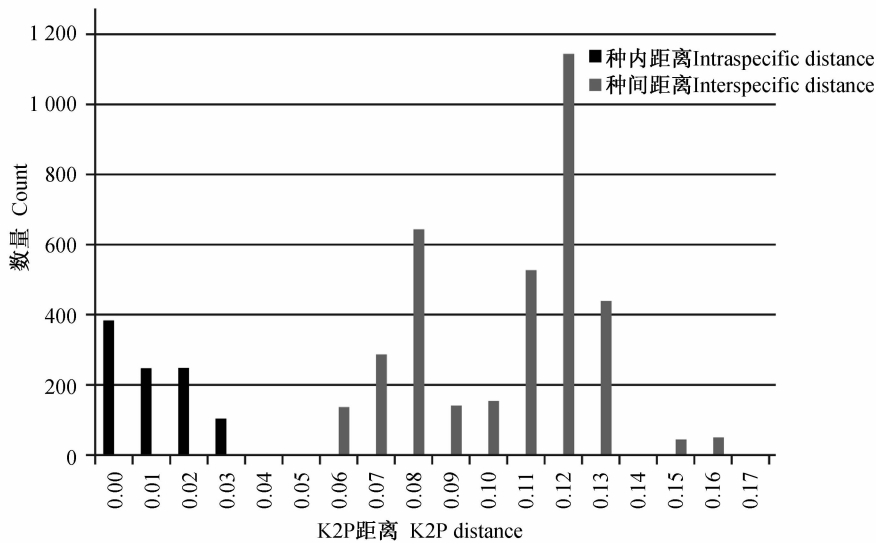


图 2 基于线粒体 COI 序列和 K2P 距离的序列差异频次图

Fig. 2 Histogram of genetic divergence using mitochondrial COI sequences. (divergences were calculated using Kimura's two parameter (K2P) model)

DNA 条形码虽然不能取代传统分类手段,但将其与形态鉴定方法的结合使用可以提高物种鉴定的效率和准确性,尤其是针对蚜虫这种对于非专业人员非常难于鉴定的物种,DNA 条形码具有非常明显的优势。本研究对桃属植物上的蚜虫进行了编码,将 DNA 条形码技术应用到果树害虫防治中,将大大提高蚜虫的防治效率,节约防治成本,并对桃树的种植做出重大贡献。

致谢:感谢为本研究收集样品的采集者,以及帮助制作玻片标本的杨分地女士。

参考文献 (References)

- Aliabadian M, Kaboli M, Nijjn V, Vences M, 2009. Molecular identification of birds performance of distance-based DNA barcoding in three genes to delimit it parapatric species. *PLoS ONE*, 4(1):e4119.
- Footit RG, Maw HEL, von Dohlen CD, Hebert PDN, 2008. Species identification of aphids (Insecta: Hemiptera: Aphididae) through DNA barcodes. *Mol. Ecol. Res.*, 8: 1189 - 1201.
- Hebert PDN, Ratnasingham S, de Waard JR, 2003. Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. Biol. Sci.*, 270: S96 - S99.

- Lee W, Kim H, Lim J, Choi HR, Kim Y, Kim YS, Ji JY, Footit RG, Lee S, 2011. Barcoding aphids (Hemiptera: Aphididae) of the Korean Peninsula: updating the global data set. *Mol. Ecol. Resour.*, 11: 32 - 37.
- Qiao GX, Wang JF, Jiang LY, 2011. Use of a mitochondrial COI sequence to identify species of the subtribe Aphidina (Hemiptera, Aphididae). *ZooKeys*, 122: 1 - 17.
- Remaudière G, Remaudière M, 1997. Catalogue des Aphididae du Monde. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris. 473.
- Sabater-Munoz B, Hidalgo NP, Latorre A, Castanera P, Footit R, von Dohlen C, 2005. DNA Barcodes: a useful character to assist in identification of aphid species in the new millennium. Proceedings of the 7th International Symposium on Aphids, Fremantle, Australia. 20.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28 (10): 2731 - 2739.
- Wang JF, Qiao GX, 2009. DNA barcoding of genus *Toxoptera* Koch (Hemiptera: Aphididae): Identification and molecular phylogeny inferred from mitochondrial COI sequences. *Insect Sci.*, 16(6): 475 - 484.
- 乔格侠, 张广学, 姜立云, 钟铁森, 田士波, 2009. 河北动物志. 石家庄: 河北科学技术出版社. 514 - 516.