

现代生物技术与蚜虫种下分类*

赵惠燕¹ 袁 锋¹ 张改生²

(1 西北农业大学昆虫研究所, 2 西北农业大学农学系, 陕西杨陵 712100)

摘 要 综述了利用现代生物技术, 即同功酶分析、线粒体 DNA RFLP 分析以及 RAPD-PCR 判别等进行蚜虫种下分类研究的概况与进展, 比较了这几种方法在蚜虫种下分类研究中的优缺点。作者认为, 同功酶法分析的是基因表达的产物, 进行种下分类有局限性, 需大量筛选最合适的酶类; RFLP、RAPD 方法较准确, 但需筛选大量限制性内切酶和随机引物。

关键词 蚜虫种下分类, 同功酶, 线粒体, 限制性片段长度多态性, 随机扩增多聚酶链反应

中图分类号 Q969.357.209

以同功酶电泳、RFLP 技术及重组 DNA 为标志的生物技术, 自提出迄今已经历了 20 多年, 这些崭新技术的出现及其在应用上的发展, 影响之广, 几乎涉及各个学科和研究领域。经典的生物学研究历来都是由宏观到微观, 由个体解剖到组织系统, 由机体水平到细胞水平, 由遗传表现型到基因型。现代生物技术的出现改变了这一传统的研究方法, 常由微观到宏观, 由基因的结构功能到编码蛋白质的功能来阐明重大的生命现象, 这就是反向生物学的研究方法。由于生命活动的本质是蛋白质的功能, 而蛋白质立体结构的信息蕴藏在其一级结构中。一级结构由基因编码, 由此, 从基因结构与功能出发去阐明复杂的生命现象在技术上既简便又迅速, 可以大大加快生命科学研究的进程。这正是现代生物技术飞速发展的原因。这些新技术广泛渗入到昆虫学各个研究领域, 才使蚜虫种下分类成为可能。

1 蚜虫种下分类的困难与意义

蚜虫种类繁多, 生殖方式奇特, 繁殖速度惊人, 适应性强, 它既能通过刺吸植物汁液, 造成直接危害, 又是病毒病的传播媒介, 引起间接危害。每年农业上可造成 15%~30% 的产量损失。蚜虫是同翅目中进化最快的类群之一, 原因在于其庞大的种群(例如, 一亩地叶片和嫩枝上的蚜虫可达 3.76×10^5 头以上^[1,2])和由此带来的较高突变频率。按照真核生物基因突变频率 $10^{-3} \sim 10^{-5}$ 计算, 一亩地上的蚜虫可有上千的突变发生。当然突变是随机多方向性的, 致死基因被淘汰, 有利基因不断积累, 新的适应种、亚种或型不断产生, 这就是几乎所有植物上都有蚜虫存在的根本原因。蚜虫这种进化快、适应性广的特点, 使一些蚜虫种内形态变异很大。相反, 又由于进化的多向性和自然选择的定向性, 使得另一些蚜虫的近缘种、近缘属的形态又极为相似, 因而极难区分近缘种和种下阶元。为此, 各国学者不断探索新方法, 以对蚜虫种下阶元进行分类。所用指标、代表物种以及研究者见表 1。

2 同功酶法与蚜虫种下分类

以同功酶方法进行分类的研究开创于 60 年代中期。尽管研究者们已在不同真核生物

收稿日期: 1994-12-23

* 国家自然科学基金资助项目

表 1 蚜虫种下分类的各种鉴定指标与方法

序号	指标与方法	代表物种	研究者
1	植物对蚜虫的抗性与耐性,以 r_m 为指标	麦二叉蚜等	Puterka G J 等
2	形态结构的统计判别分析,多个形态指标	多种蚜虫	Dixon A D F 等
3	用被食过的植物饲养蚜虫观察同种不同克隆群蚜虫反应	麦二叉蚜等	Form Esan S 等
4	黄化叶百分率比较、病理学指标	麦双尾蚜等	Puterka G J
5	对杀虫剂的敏感与否	棉蚜、桃蚜	O'brine P J 等
6	天敌对蚜虫的取食与寄生的喜好	樟树蚜等	Russell H 等
7	染色体细胞学判别(长度分析)	棉蚜、麦二叉蚜	赵惠燕、Mayo Z B 等
8	同功酶差异分析,以谱带多寡与密度为指标	麦蚜、桃蚜、麦长管蚜等	May R B 薛增召等
9	DNA 印迹法	桃蚜等	Weber G 等
10	RFLP 法	悬钩子蚜等	Birch A N E 等
11	RAPD-PCR 法	桃蚜、棉蚜、豆蚜	Cenis J L 等
12	DNA 的时空分布	桃蚜等	Schutran K A 等
13	线粒体 DNA 多态	禾谷缢管蚜、麦二叉蚜	Martinez D 等

中建立了总共 57 种同功酶的分析技术,但就某一生物而言,可供分析的同功酶很少。就蚜虫种下分类,有的研究认为:同功酶电泳技术能简单有效地测定个体和种群中的遗传变异^[3]。大部分研究结果表明:种间有差异,种内克隆群间无差异或差异极小^[4~8]。然而,Steiner 等对采自美国南部和西部四地区的玉米蚜 *Rhopalosiphum maidis*(fitch)不同地理群所作的同功酶研究表明,不同地理群间同功酶的差异显著^[9,10],因而对众所公认的玉米蚜北迁的理论提出挑战。蚜虫种下分类所用的酶类见表 2。

表 2 蚜虫种下分类所用过的酶类

酶类	符号	酶类	符号
酸性磷酸酶	ACPH	碱性磷酸酶	ALKPH
醇脱氢酶	ADH	淀粉酶	AMY
过氧化物酶	POD	醛氧化酶	AO
正负酯酶	±EST	延胡羧酸酶	FUM
葡萄糖脱氢酶	GDH	谷草转氨酶	GOT
异柠檬酸脱氢酶	IDH	苹果酸脱氢酶	MDH
苹果酸酶	ME	6-磷酸葡萄糖脱氢酶	6-P-GDH
葡萄糖磷酸变位酶	PGM	山梨醇脱氢酶	SORDH
羟基丁酸脱氢酶	HBDH	酪氨酸酶	TYR
黄嘌呤脱氢酶	XDH	磷酸己糖异构酶	PHI
亮氨酸氨基肽酶	LAP	乌头酸酶	ACO
己糖激酶	HK	谷氨酸脱氢酶	GDH
乳酸脱氢酶	LDH	肽酶	PEP

在诸多种类的同功酶中,对种下克隆群或型表现有差异的仅为个别种类。例如:Suo-malainen 等^[3]用豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* (Harris)试验,仅发现一种同功酶在克隆间有差异,而参试的 18 种酶均无差异。May 等(1978)在桃蚜 *Myzus persicae* (Sulzer)9 个种群的同功酶中没有发现异质性,在马铃薯长管蚜 *Macrosiphum taphorbiae* (Thomas)中仅发现微小差异,占 0.07%。Abid 等^[4]用 12 种同功酶研究了麦二叉蚜 *Schizaphis graminum* (Rondani)等 6 种生物型的种内差异,仅 6-磷酸葡萄糖脱氢酶 6-PGDH 表现有种内差异。因此,用同功酶电泳方法进行蚜虫种下分类,首先要大量筛选合适的酶类,否则

表 3 禾谷缢管蚜种群用内切酶 Hind III 所获变异片段的分布与频率

虫源地	克隆数	变异片段的大小(kb)					kd 变异系数
		2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	
Madrid	11	—	0.091	—	0.818	0.091	0.286
Zaragoza	14	—	0.071	0.214	0.714	—	0.408
Cordoba	7	—	—	—	0.857	0.143	0.210
Tarragona	3	0.339	0.333	—	0.333	—	0.445
合计	35	0.029	0.086	0.086	0.743	0.057	0.465

Powers 等用 11 种限制性内切酶对麦二叉蚜 mtDNA 提取液进行内切发现:同型不同克隆间无差异^[13]。通过比较 mtDNA 限制性多态图谱,确定了麦二叉蚜种下型 B、C、E 和 F。比较这 4 种生物型核酸序列共享片段发现:由于长期进化,这些生物型已经分化了普通祖先的 mtDNA。多态片段分析结果表明:生物型 C 与 E 的关系较近;生物型 B 与 C、E 相对等距,而生物型 F 是独特的 mtDNA 品系,其关系如图 2 所示。

4 RAPD-PCR 与蚜虫种下分类

1990 年美国两个独立的研究室几乎同时报道了一种崭新的分子生物技术——随机扩增多聚酶链反应(Randomly Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction, 简称为 RAPD-PCR^[13,14])。它利用的是生物体内 DNA 复制的原理,在试管中用随机设计的单个寡核苷酸引物,在嗜热 TaqDNA 聚合酶的催化下,使提取的 DNA 经过几十次变性、复性、链延长的循环,将 DNA 多态片段扩增达肉眼可观测。这种方法省去了传统生物工程中的建库(DNA 文库)、筛库和筛探针等一套费时、费力的操作,简便而快速地将不同生物材料的 DNA 成指数递增。通过扩增能产生随机多态性 DNA 谱带,而这种图谱又为每种生物所特有。因此,它能有效地作为研究近缘种和种下分类的标记。由于 RAPD-PCR 的引物是随机合成的,无需预先知道被研究生物的基因组核苷酸排列顺序,这样,研究者可以使用多个随机引物获得大量的 DNA 多态性。通过比较不同物种的遗传标记,即可对生物进行快速有效的鉴定与分类,这使得利用生物技术进行分子分类的方法大大前进了一步。

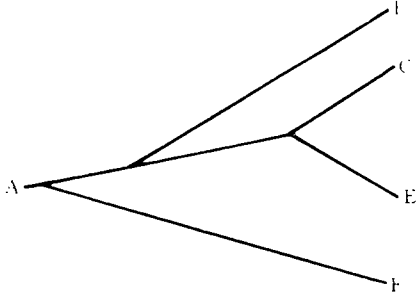


图 2 麦二叉蚜生物型 mtDNA 分析结果
(据 Powers 等资料绘制)

在蚜虫种间或种内用 RAPD-PCR 法可产生一系列分离的 DNA 片段(图 3),这些片段变异范围很大,常在 100~2 000 bp 之间,以用于区别种间或种内差异和鉴定。例如:在麦双尾蚜 *Diuraphis noxia* (Mordvilko) 的不同地理群间明显存在多态性;南非种群中存在有一套低密度条带(180~650 bp),而叙利亚种群则无;南非种群在 1900, 650 和 440 bp 的条带上表现多态性,成为两种基因型,而叙利亚种群仅表现一种基因型。

麦二叉蚜地理生物型近年来成为研究的热门,已经分化为 A、B、C、D、E、F、G、H 8 个地理生物型。除了 2 种生物型表现全周期外,大多生物型都是孤雌生殖^[17]。1993 年 Black 用 RAPD-PCR 对 8 个地理生物型间和生物型内的 DNA 进行检测,发现大量随机引物

中,BAM 能检出较多的型间多态,可用于生物型的快速鉴定。

比较蚜虫种下分类所用的同功酶分子分类,mtDNA 的 RFLP 分析以及 RAPD-PCR 判别三种方法,各有其优缺点。与同功酶分子分类方法相比,RFLP 与 RAPD 多态分类的优点在于:研究对象是遗传物质本身(不象同功酶标记是研究基因转录翻译加工的产物),不受显隐性关系、环境条件和发育阶段的影响;RFLP 方法不仅可以测出编码区的变异,也可测出非编码区的变异。另外,RFLP 起源于 mtDNA 的自然变异,可获得能反映遗传物质种类学特征的大量多态性,用以物种分类或组建高密度遗传图谱。

用 RFLP 与 RAPD 多态进行蚜虫种下分类有其独特的优点及充分的可靠性。但 RFLP 多态的取得依赖于限制性内切酶识别 DNA 位点中碱基的改变或识别位点的位置移动,这很大程度上限制了该方法的应用。另外,mtDNA 的 RFLP 种下分类需要进行多种酶切、标记、转移、分子杂交等工作,步骤多、工作量大,并且接触的放射性污染也多,价格昂贵,这些给大量研究带来一定的困难。据统计,用同功酶进行分类的蚜虫种数仅占用 mtDNA RFLP 与 RAPD-PCR 判别的 1/3,而后的分类速度则为前者的 1/10。另外同功酶分析的是基因表达的产物,因而分析种内差异具有一定的局限性。后两种方法起源于 DNA 的自然变异,在数量上几乎不受限制,可随机选取足够量的能代表整个基因组的标记。特别是 RAPD-PCR 检测速度快,不需大量限制酶等昂贵试剂和建库筛库等复杂手续,更无需知道序列信息的探针。还有 RAPD-PCR 所需样品的 DNA 量很少,仅几个 ng(纳克)甚至几个 pg(微微克)就能清晰看到扩增产物的遗传多态性,而所需要的 DNA 量仅是 mtDNA RFLP 的 0.1%~0.5%。这对于单头蚜虫样品受限制的情况大有用处。用 RAPD-PCR 进行蚜虫种下分类可以与计算机联接处理数据,使结果更可靠快速。

RAPD-PCR 技术已被广泛用于物种分类和鉴定、研究系统发育及绘制系统发育图,尤其在种内水平。当然,RAPD-PCR 也有某些缺陷,如不能准确区分杂合子,扩增产物不稳定等。但其能在一根试管内将所要研究的一个目的基因或某一 DNA 片段在数小时内扩增千万乃至千百万倍,使肉眼可直接观察和判断该基因或该 DNA 片段的存在,这无疑是一项“具有革命性的创举”,上述这些生物技术对生物分类,乃至整个生命科学的发展具有不可估量的促进作用。

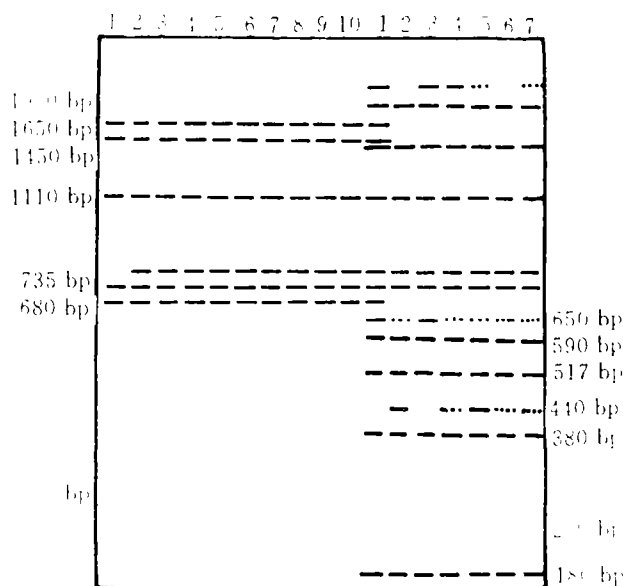


图3 用 RAPD-PCR 方法扩增的麦双尾蚜 DNA 片段
前 10 条带是单个母蚜繁殖的 10 个后代的叙利亚地理型,后 7 条带
是南非地理型成虫和若虫混合种群的 7 个个体的扩增片段

参 考 文 献

- 1 Dixon A F G. Aphid ecology. Blakie; Blakie & Son Ltd Publication, 1985. 17~67
- 2 赵惠燕. 漫话蚜虫. 大自然, 1988(2), 57~58
- 3 Suomalainen E. Genetic polymorphism and evolution in parthenogenetic animals. N. Absence of variation within parthenogenetic aphid clones. *Theor and Appl Genet*, 1980, 57, 129~132
- 4 Abid H S, et al. Isozyme characterization of sorghum aphid species and greenbug biotypes. *Ann Entomol Soc Am*, 1989, 82, 303~306
- 5 Loxdale H D, et al. Electrophoretic study of enzymes from cereal aphid populations I ~ V. *Bull Entomol Res*, 1983 ~ 1988, 73, 645~657, 75, 121~141, 78, 241~249
- 6 Loxdale H D. Estimating levels of gene flow between natural population of cereals aphids. *Bull Entomol Res*, 1990, 80, 331~338
- 7 Mayo Z B, et al. Variation in chromosome length among five biotype of the greenbug. *Ann Entomol Soc Am*, 1988, 31, 128~131
- 8 Nemec V, Stary P. Genetic polymorphism in *Aphidius ervi* Hal, an aphid parasitoid on microtophium carnosum. *Ann Entomol Soc Am*, 1983, 95, 345~350
- 9 Steiner W W M, et al. Genetic differentiation and its bearing on migration in north American population of the corn leaf aphid, *Rhopalosiphum maidis* (fish). *Ann Entomol Soc Am*, 1985a, 78, 518~525
- 10 Steiner W W M, et al. Electrophoretic comparison of aphid species. detecting differences based of taxonomic status and host plant. *Jour Compar Biochem and Physiol B*, 1985b, 81, 295~299
- 11 Powers T O, et al. Mit DNA divergence among greenbug biotypes. *Ann Entomol Soc Am*, 1989, 32, 298~302
- 12 Martinez D, et al. Mitochondrial DNA variation in *Rhopalosiphum padi* populations from four Spanish localities. *Ann Entomol Soc Am*, 1992, 85, 241~246
- 13 Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18, 6531~6535
- 14 Williams J G K, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18, 7213~7218
- 15 Black N W C, et al. Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids. *Bull Entomol Res*, 1992, 82, 152~159
- 16 Cenis J L, et al. Identification of aphid species and clones by Random Amplified Polymorphic DNA. *Ann entomol Soc Am*, 1993, 86(5), 545~550
- 17 Puterka G J, et al. Rapid technique for determining greenbug biotypes B, C, E, and F. *Jour Econ Entomol*, 1988, 81, 396~399

A Review of Modern Biotechnique and Intraspecific Classification of Aphids

Zhao Huiyuan Yuan Feng Zhang Gaisheng

(Department of Plant Protection, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi, 712100)

Abstract The general situations and the advances of scientific researches on aphid intraspecific classification by means of the modern biotechnique, including isozyme analysis, RFLP of mitochondrial DNA and RAPD-PCR, are reviewed. The advantage and disadvantage of the three methods in the research of the aphid intraspecific classification are compared. Because there are limitations in the analysis of isozyme, a great quantity of appropriate isozymes should be selected. The method of RFLP and RAPD is accurate, but the RAPD is even simpler and time-saving.

Key words Aphid, intraspecific classification, isozyme, mtDNA, RFLP, RAPD-PCR