

# 紫外线诱导对桃蚜生态学及线粒体 基因 CO<sub>1</sub> - 突变的影响

都二霞,赵惠燕,郭剑文

(西北农林科技大学 植保资源与病虫害防治教育部重点实验室;昆虫博物馆,陕西 杨凌 712100)

**[摘要]** 为了揭示紫外线诱导桃蚜的生态学及分子变异的遗传效应,以在正常环境中生长的桃蚜为对照,研究了紫外线不同辐射强度(15,30,45 W)和时间(2,6 h)对桃蚜(*Myzus persicae*)生态学参数以及线粒体基因 CO<sub>1</sub> - 突变的影响。结果表明,不同辐射处理对桃蚜 F<sub>2</sub> 代的主要种群参数均有不同程度的影响:当辐射时间为 2 h 时,紫外线强度为 15 W 处理的桃蚜种群内禀增长率最高,达 0.265;当辐射时间为 6 h 时,内禀增长率随紫外线辐射强度的增加而缓慢上升。与对照相比,低强度(15 W)紫外线处理桃蚜的平均世代周期和净增殖率较其他处理明显增加。对紫外线诱导桃蚜线粒体基因 CO<sub>1</sub> - 进行测序可知,15 W 紫外线辐射 2 h 处理桃蚜的线粒体基因 CO<sub>1</sub> - 发生单碱基突变,而 45 W 紫外线辐射 6 h 处理桃蚜的线粒体基因 CO<sub>1</sub> - 突变位点达 9 个。说明紫外线诱导对当代桃蚜的生态学 and 分子变异的影响已经遗传给了后代。

**[关键词]** 紫外线诱导;桃蚜;生态学;线粒体基因 CO<sub>1</sub> -

**[中图分类号]** S436.621.2<sup>+</sup>1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2007)09-0123-04

## UV-induced ecological response and CO<sub>1</sub> - mutation of *Myzus persicae*

DU Er-xia, ZHAO Hui-yan, GUO Jian-wen

(Key Laboratory of Plant Protection and Pest Management, Ministry of Education & Entomology Museum, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** In order to reveal UV-induced ecological and molecular mutational genetic effects of *Myzus persicae*, the biological response and CO<sub>1</sub> - mutation were observed compared with the normal control after different treatments, including time and intensity (15, 30, 45 W) time (2, 6 h). The results indicated that based on the life-fecundity table of irradiation population in labs, the ecological parameters changed with the time and intensity; after two-hour UV irradiation, the intrinsic rate reached the top, 0.265; after six-hours UV irradiation, the intrinsic rates showed the increasing tendency with the strengthening of ultraviolet radiation; in addition, compared with the control, the other parameters increased obviously. According to mtDNA CO<sub>1</sub> - sequences, there was only 1 site producing mutation for the treatment (15 W-2 h), while as for the other treatment (45 W-6 h) 9 variable sites were found. Moreover, this work demonstrated that the ecological and gene mutation had been delivered to the progeny.

**Key words:** ultraviolet radiation; *Myzus persicae*; ecology; mitochondrial DNA (mtDNA) CO<sub>1</sub> -

†收稿日期] 2006-08-14

[基金项目] 国家自然科学基金项目(39970112, 30470268); 陕西省重点项目(2001SM01)

[作者简介] 都二霞(1979-), 女, 河南焦作人, 在读博士, 主要从事昆虫生态学研究。E-mail: duerxia@163.com

[通讯作者] 赵惠燕(1956-), 女, 河南西平人, 教授, 博士生导师, 主要从事昆虫生态学研究。

桃蚜(*Myzus persicae*)又名烟蚜、桃赤蚜,属同翅目蚜科瘤蚜属。其庞大的种群加上环境胁迫下较高的突变频率,导致其进化及种下分化迅速,因而成为同翅目种群中进化最快、分布最广、危害最大的类群之一。

环境胁迫主要包括大气污染、农药的频繁使用、极端高温、微波、辐射等多种因素,而紫外线(UV)远古至今一直是蚜虫无法摆脱的胁迫因子,加上人类活动的干扰使地表紫外线辐射加强,进而对蚜虫生长发育、生殖、存活造成强大的选择压力,并成为种群适应性反应的进化动力,将导致蚜虫物种的遗传分化和基因流动<sup>[1]</sup>。

试验证明,紫外线可导致基因突变或染色体畸变<sup>[2]</sup>。国内外大多研究集中在植物胁迫和小鼠基因的调控与修复上。Rebolla 等<sup>[3]</sup>研究证实,经紫外线辐射后,黑腹果蝇三龄幼虫唾液腺肿瘤抑制基因 *P53* 同系物组蛋白 H3 乙酰化增加;张建民等<sup>[4]</sup>用紫外线辐射果蝇,结果表明,果蝇子代数量减少,羽化时间缩短,质量减轻。但研究蚜虫是连续 3 代处理,未证明此效应是否遗传;姚建秀等<sup>[5]</sup>采用连续辐射诱导麦长管蚜 DNA 多态性的 RAPD 分析,证明了紫外线是诱导蚜虫变异的条件之一,但紫外线辐射处理时间过长,不符合自然界条件。

本试验研究了不同辐射时间和强度下紫外线对桃蚜主要生态学参数及线粒体基因 *CO* - 突变的影响,以期揭示昆虫对紫外线辐射的生态学反应,为探明蚜虫生态遗传与进化机制提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

桃蚜采自陕西杨凌西北农林科技大学;紫外灯具购自北京京西公司。

### 1.2 桃蚜的饲养

将采集的桃蚜带回室内,在油菜叶片上进行繁殖,待成熟后取 1 头发育良好的成蚜,置于带滤纸的培养皿(直径 7cm 的市售塑料培养皿)中,每日供以新鲜油菜叶,在叶柄部加湿棉球保湿,每 2 d 更换 1 次,保证寄主新鲜,在室温 20 ~ 23 ℃、相对湿度 51 % ~ 62 %、每天光照 12 h 左右的条件下饲养 4 ~ 5 代,待成蚜产仔后将母蚜用毛笔轻轻转移剔除,此时的桃蚜为单克隆系。待单克隆系桃蚜达到试验要求数量后,取发育较好的一代单克隆系桃蚜备用。

### 1.3 UV 处理

紫外线灯光源功率分别为 45, 30, 15 W(长 88

cm,直径 2.5 cm),波长均为 257 nm。取 1.2 中单克隆系无翅成蚜,在不同功率紫外线光源下 30 cm 处各放 100 头,每天分别辐射 2 和 6 h,共计 6 个处理,分别为 15 W-2 h、30 W-2 h、45 W-2 h、15 W-6 h、30 W-6 h 和 45 W-6 h。待此代成蚜产仔后去除成蚜,将此未辐射  $F_2$  代若蚜接于油菜上,观测其生物学特性并进行分子标记。对照组为在正常环境中生长的桃蚜,饲养条件同 1.2。

### 1.4 种群参数计算

每处理 30 头  $F_2$  代桃蚜,即 30 个重复。单头饲养,幼虫期每天观察蜕皮情况,成虫期每天观察记录产仔数,直至蚜虫死亡。平均世代周期、净增殖率和内禀增长率等参数参照丁岩钦<sup>[6]</sup>的方法进行计算。

净增殖率  $R_0$ :指种群经过一个世代后的增殖倍数。

$$R_0 = l_x \times m_x。$$

式中, $x$  为试验天数, $l_x$  为蚜虫每天的存活分数, $m_x$  为特定年龄生殖率,以平均每个雌体的产雌率表示。

平均世代周期  $T$ :指从亲代出生至子代出生的平均周期。

$$T = x \times l_x \times m_x / l_x \times m_x。$$

内禀增长率  $r_m$ :指在给定的物理和生物的条件下,具有稳定的年龄组配种群的最大瞬间增长率,即  $r_m$  为瞬间出生率与瞬间死亡率之差。

$$r_m = \ln R_0 / T。$$

### 1.5 桃蚜线粒体基因 *CO* - 的序列分析

单头桃蚜 DNA 提取参照安瑞生等<sup>[7]</sup>的方法进行。线粒体基因 *CO* - 特异引物参考 Sunnucks 等<sup>[8]</sup>选用的引物,其序列为:上游引物:5'-GGAA T-ACCTCGACGATA TACA G-3';下游引物:5'-CCG-CAAATTTCTGAACA TTGACC-3'。

PCR 反应体系为:模板 DNA 1  $\mu$ L,上、下游引物各 1.5  $\mu$ L(10 pmol/ $\mu$ L),dNTP(各 2.5 mmol/L) 2  $\mu$ L, *Taq* 酶 1.5  $\mu$ L(0.5 U/ $\mu$ L),10  $\times$ buffer(含  $Mg^{2+}$ ) 2.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 为 12.5  $\mu$ 。

PCR 扩增在 Eppendorf DNA 扩增仪上进行,反应条件为 94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 45 s,52 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 45 s,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。扩增产物用 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。

对 15 W-2 h、45 W-6 h 两个处理的桃蚜线粒体基因 *CO* - 扩增产物进行测序,利用 ClustalW EBI 软件对 DNA 序列进行编辑、校对和校准。将校准后的 DNA 序列在 Genbank 库中查找同源序

列,以确定所获得的序列为目标序列。

## 2 结果与分析

### 2.1 紫外线辐射对桃蚜平均世代周期的影响

不同强度紫外线辐射不同时间对 F<sub>2</sub> 代桃蚜种群内禀增长率  $R_m$ 、净增殖率  $R_0$  和平均世代周期  $T_3$  主要生态学参数的影响见表 1。

从表 1 可见,不同紫外线辐射强度和时间对桃蚜生态学主要参数均有不同程度的影响。与对照相比,低强度(15 W)紫外线处理桃蚜的平均世代周期均明显增加,表明低强度紫外线处理延长了桃蚜完成一个

世代的发育时间。其中 15 W-2 h 和 15 W-6 h 处理分别较对照延长了 1.67 和 2.43 d。在同一辐射时间内,当紫外线强度超过 15 W,平均世代周期缩短;在同一紫外线强度下,随着辐射时间的延长,平均世代周期相应延长。综上所述,在低强度(15 W)紫外线辐射下,桃蚜表现出适当的刺激反应,表现为平均世代周期延长;而在高强度与长时间的紫外线辐射,即高剂量紫外线辐射条件(45 W-6 h)下,桃蚜亦表现为平均世代周期的延长,表明其种群对紫外线辐射的耐受力增加。这与前人的研究结果基本一致<sup>[9]</sup>。

表 1 不同紫外线处理对桃蚜主要生态学参数的影响

Table 1 Effect of ecology parameters of *Myzus persicae* by different UV-irradiation

辐射处理 Radiation	平均世代周期 $T/d$ Mean generation time	净增殖率 $R_0$ Net reproduction rate	内禀增长率 $r_m$ Intrinsic rate of increase
CK	16.86	49.91	0.232
15 W-2 h	18.53	57.70	0.265
30 W-2 h	14.65	47.90	0.219
45 W-2 h	14.86	51.53	0.227
15 W-6 h	19.29	77.72	0.226
30 W-6 h	17.55	68.66	0.240
45 W-6 h	18.13	77.43	0.241

### 2.2 紫外线辐射对桃蚜净增殖率的影响

从表 1 可知,在同一紫外线强度下,随着辐射时间的增加,净增殖率呈增加的趋势;在同一辐射时间内,15 W 强度紫外线处理的净增殖率较其他强度紫外线处理均有明显增加。表明低强度紫外线辐射使桃蚜种群的繁殖数量增加,这是由于桃蚜基因突变而获得抗性还是由于环境胁迫引起的短期刺激反应,还需进一步研究。

### 2.3 紫外线辐射对桃蚜内禀增长率的影响

由表 1 看出,除了 15 W-2 h 处理外,当紫外线辐射时间相同时,内禀增长率随着辐射强度的增加而缓慢上升。虽然 15 W-2 h 处理中紫外线辐射剂量较低,但桃蚜种群的内禀增长率却最高,为 0.265,这可能是由于低剂量紫外线的刺激效应所致。由于内禀增长率与净增殖率的自然对数成正比,与平均世代周期成反比,而 15 W-2 h 处理的平均世代周期较长,说明其内禀增长率的增加主要是净增殖率的贡献所致。

以上研究表明,紫外线辐射基本对桃蚜种群的平均世代周期有延长作用,对其繁殖起促进作用。种群生态反应与紫外线辐射强度和时间有关,低强度(15 W)紫外线处理延长了平均世代周期,但是由于净增殖率的上升,最终导致内禀增长率呈现上升趋势。

综上所述,本研究对象为紫外线辐射后 F<sub>2</sub> 代未

辐射桃蚜,与对照相比,F<sub>2</sub> 代桃蚜主要生态学参数均发生了变化,表明 F<sub>1</sub> 代将紫外线辐射的生态反应遗传给了 F<sub>2</sub> 代。说明紫外线诱导桃蚜当代产生的生态反应是可以遗传的。

### 2.4 紫外线诱导桃蚜线粒体基因 CO - 的序列分析结果

对紫外线诱导桃蚜线粒体基因 CO - 的 PCR 扩增结果表明,PCR 扩增片段大小约为 900 bp (图 1)。

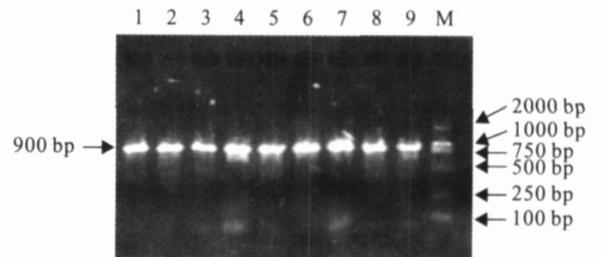


图 1 桃蚜线粒体基因 CO - PCR 扩增的结果

1,5,9. F<sub>2</sub> 代对照;2~4. 15,30,45 W 紫外线辐射 2 h;  
6~8. 15,30,45 W 紫外线辐射 6 h  
Fig. 1 PCR amplification of mtDNA CO -  
1,5,9. CK of F<sub>2</sub> generation;2-4. UV radiation for 2 h,  
with 15 W,30 W,45 W lamp, separately  
6-8. UV radiation for 2 h,with 15 W,30 W,  
45 W lamp, separately

将测序得到的 15 W-2 h 和 45 W-6 h 两个处理

的桃蚜线粒体基因 *CO* - 序列进行校准比对可知,其序列长度均为 678 bp。对 15 W-2 h 处理桃蚜线粒体基因 *CO* - 序列,只有 432 bp 的序列可用于分析,在 432 bp 的序列中只有 1 个位点碱基(612 bp, T-A) 发生变异,约占分析位点数的 1%;对 45 W-6 h 处理桃蚜线粒体基因 *CO* - 序列,只有 447 bp 的序列可用于分析,在 447 bp 的序列中有 9 个位点碱基发生变异(转换和颠换),其分别是 C-A (198 bp)、G-A (379 bp)、G-A (437 bp)、A-G (446 bp)、A-G (535 bp)、G-T (550 bp)、A-T (560 bp)、T-A (571 bp)、A-T (618 bp),且无碱基的缺失和插入,约占分析位点数的 3%。

### 3 讨 论

(1) 从本试验结果可以看出,紫外线诱导桃蚜当代产生的生态学反应可以遗传。未经紫外线辐射的供试  $F_2$  代桃蚜,生态学参数与对照相比明显不同,说明其生态学特征并没有因为环境的恢复而恢复,而是遗传了紫外线照射桃蚜当代的特征。

(2) 本研究中,紫外线处理引起的桃蚜生态学反应与辐射强度和时间有关。因为辐射效应是累积的,Kenji 等<sup>[10]</sup>的研究表明,对于小鼠,单次剂量与重复剂量所引起的症状和突变频率均相等,表明剂量效应取决于吸收能量的大小,而不取决于辐射时间的长短。本研究中,15 W 紫外线辐射 6 h 增强了桃蚜对紫外线的抗性,延长了平均世代周期,使净增殖率增加,即刺激了桃蚜的生殖力,这与前人在其他生物上的研究结果相似<sup>[9]</sup>。

(3) 本研究中,紫外线辐射导致  $F_2$  代桃蚜线粒体基因 *CO* - 发生变异。线粒体基因中 *CO* 和 *CO* 是应用频率最多的分子标记之一,经常用于分析亲缘关系密切的种、亚种及地理种群之间的系统<sup>[11]</sup>。本试验以处理桃蚜的子代( $F_2$  代)作为研究对象,结果表明,不同强度紫外线辐射、不同时间处理间桃蚜线粒体基因 *CO* - 的突变位点有差异,说明紫外线诱导对桃蚜基因变异的影响,已经由当代遗传给后代,可知紫外线辐射具有遗传性。这与在人类和其他动物上的研究结果一致<sup>[12-14]</sup>。因为生物肌体对辐射具有一定的抗性,这是因为无论直接作用还是间接作用造成的损伤,肌体都具有一定的修复和再生能力。但损伤超过一定限度,肌体不能修复和再生,这就导致细胞的死亡或在 DNA 中留下潜在的变异基因<sup>[15]</sup>。

(4) 本研究采用了间断性辐射(重复强度)而不是持续辐射(单次强度),且辐射后不用黑布包裹,光复活效应仍存在,同时基于蚜虫的孤雌生殖特点,试验材料均为单克隆系桃蚜,且让当代桃蚜处于逆境紫外线下,然后对其  $F_2$  代进行研究,因此从遗传学上降低了桃蚜为了适应环境,而暂时改变其生态学习性的可能性。

由于室内食料、营养、温度及光照等条件的限制,桃蚜在单一寄主上不可避免的产生自然衰退,会降低本身的抗辐射,给试验带来一定误差。所以,需要在低强度紫外线范围内,使用多种强度,且在试验的不同时段测定;而且需要增加试验对象(如其他昆虫或其他种)和供试昆虫的代数来增加统计效度,至于辐射诱导导致哪些位点和基因发生变异,则需要建立差减文库进行大面积的分子克隆来全面筛选特异基因,进行更精确更深入的研究。

### [参考文献]

- [1] Inaizumi M. Life cycle of *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae) with special reference to biotype differentiation on various host plants[J]. Kontyu, 1981, 49(2): 219-240.
- [2] Kiyoji T, Shinya K, Yan R. UV-induced skin carcinogenesis in xeroderma pigmentosum group A (XPA) gene-knockout mice with nucleotide excision repair-deficiency [J]. Mutation Research, 2001, 477(2): 31-40.
- [3] Rebollar E, Valadez-Graham V, Vazquez M, et al. Role of the p53 homologue from *Drosophila melanogaster* in the maintenance of histone H3 acetylation and response to UV-light irradiation[J]. FEBS letters, 2006, 580(2): 642-648.
- [4] 张建民. 紫外线对黑尾果蝇的生物学效应[J]. 昆虫知识, 1994, 31(4): 242-244.
- [5] 姚建秀, 赵惠燕. 紫外条件诱导下麦长管蚜 DNA 的变异研究[J]. 西北农业学报, 2001, 10(1): 33-36.
- [6] 丁岩钦. 昆虫数学生态学[M]. 北京: 科学出版社, 1993: 252-316.
- [7] 安瑞生, 谭声江, 陈晓峰. 小型昆虫 DNA 提取时匀浆方法的改进[J]. 昆虫知识, 2002, 39(4): 311-312.
- [8] Sunnucks P, Driver F, Brown W V. Biological and genetic characterization of morphologically similar *Therioaphis trifolii* (Homoptera: aphididae) with different host utilization[J]. Bulletin of Entomological Research, 1997(87): 425-436.
- [9] Joiner M C, Lambin P, Malaise E P, et al. Hypersensitivity to very-low single radiation dose: its relationship to the adaptive response and induced radioresistance[J]. Mutation Research, 1996, 358: 171-183.

(下转第 131 页)

Radchuk 等<sup>[7]</sup>以 100 mg/L Km 作为苹果品种 Florina 的选择压,获得了 *rolB* 基因的转化植株。师校欣等<sup>[8]</sup>以 5~10 mg/L Km 作为乔纳金、王林等苹果品种的选择压,获得了豇豆胰蛋白酶抑制剂基因的转化植株。本试验发现,“嘎啦”叶片对 Km 非常敏感,10 mg/L Km 即可抑制非转化不定芽的分化,尽管 5 mg/L Km 也可以明显抑制非转化不定芽的分化,但为了减少假阳性植株的发生频率,本试验采用在含 10 mg/L Km 的筛选培养基上进行 3~4 次的筛选,可以有效地筛选掉逃逸芽。

(4) 延迟筛选法可以使经过农杆菌侵染的外植体有一个缓冲,即其生理状态得到一个恢复过程,有利于转化细胞的分化。刘静等<sup>[9]</sup>研究认为,在共培养后延迟 3 d 进行选择,可以提高苹果砧木 M26 的转化效率。笔者认为共培养后进行 4 d 的延迟筛选对“嘎啦”叶片转化具有重要意义,虽然非转化细胞也同时得到了恢复,但其后在筛选培养基上连续筛选,再转到含有 10 Km mg/L 的生根培养基上诱导生根,可有效地淘汰非转化植株,转化植株的生根率达到了 60% 以上。

在遗传转化中难免会出现假阳性芽,这就需要从分子生物学水平上进行 Southern 和 Northern 杂交的进一步检测,以确定外源基因确实整合到受体

植物的基因组中。本试验的杂交检测和抗病性鉴定等工作正在进行。

#### [参考文献]

- [1] 联合国粮食及农业组织统计数据库 [DB/OL]. <http://www.fao.org>.
- [2] 董汉松. 植物诱导抗病性原理和研究 [M]. 北京: 科学出版社, 1995.
- [3] 杨莉, 徐昌杰, 陈昆松. 果树转基因研究进展与产业化展望 [J]. 果树学报, 2003, 20(5): 331-337.
- [4] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [5] Eun S S, Kwan J S, Sung J, et al. Silver nitrate and aminethoxyvinylglycine affect Agrobacterium mediated apple transformation [J]. Plant Growth Regulation, 2005, 45: 75-82.
- [6] 刘庆忠, Salih S, Hammerschlag F A. 茎段外植体白化处理促进“皇家嘎啦”苹果不定芽再生 [J]. 落叶果树, 2001(1): 4-7.
- [7] Radchuk V V, Korkhovoy V I. The *rolB* gene promotes rooting *in vitro* and increases fresh root weight *in vivo* of transformed apple cultivar ‘Florina’ [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2005, 81: 203-212.
- [8] 师校欣, 王斌, 杜国强, 等. 根癌农杆菌介导豇豆胰蛋白酶抑制剂基因转入苹果主栽品种 [J]. 园艺学报, 2000, 27(4): 282-284.
- [9] 刘静, 邵建柱, 徐继忠, 等. 农杆菌介导将 *LFY* 基因导入苹果的研究 [J]. 河北农业大学学报, 2006, 29(3): 6-9.

(上接第 126 页)

- [10] Kenji O, Masami S, Jun L, et al. Toxicity of theophylline depends on plasma concentration by single and also repeated dosint in rats [J]. Pharmacological research, 2001, 44(2): 81-87.
- [11] Crozier R H, Crozier Y G, Mackinlav A G. The *CO* and *CO* region of honeybee mitochondrial DNA: evidence for variation in insect mitochondrial DNA evolutionary rates [J]. Molecular Biology Evolution, 1989, 6: 399-411.
- [12] Peak J G, Pilas B, Dudek E J, et al. DNA breaks caused by mono chromatic 365nm ultraviolet-A radiation and their re-pair in human epithelioid and xeroderma pigmentosum cell [J]. Photo Chem Photobiol, 1991, 54(2): 197-203.
- [13] Heo M Y, Kim S H, Yang H E, et al. Protection against ultraviolet B and C-induced DNA damage and skin carcinogenesis by the flowers of *Prunus persicae* extract [J]. Mutation Research, 2001, 496: 47-59.
- [14] 余多慰, 柯惟中. 水溶液中 DNA 紫外辐射损伤的分子机制研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2000, 20(3): 311-314.
- [15] 都二霞, 郭剑文, 赵惠燕. 紫外线诱导桃蚜 DNA 变异的研究 [J]. 应用生态学报, 2006, 17(7): 1245-1249.