

马拉硫磷对东亚飞蝗不同种群遗传结构的分化研究

郑先云¹, 党莉¹, 郭亚平¹, 贺艳萍^{1,2}, 马恩波¹

(1.山西大学生命科学与技术学院, 山西 太原 030006; 2.中国农业大学昆虫学系, 北京 100094)

摘要:以接近于 LD₅₀ 的马拉硫磷处理东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) 天津北大港和山东无棣种群个体, 用 SSRP-PCR 标记技术分析检验东亚飞蝗在不同选择压力下, 存活个体与死亡个体的基因型与马拉硫磷致死作用的可能相关关系。结果表明, 无棣种群死亡组的多态性明显高于存活组, 而北大港种群存活组的多态性高于死亡组, 北大港群体的多态性高于无棣群体。各多态位点与马拉硫磷致死性相关性检测表明: 第一, 相同引物的不同位点对马拉硫磷的敏感性不同, 不同种群对马拉硫磷致死性存在相关性的位点不同; 第二, 不同处理的东亚飞蝗在同一引物扩增出的同一位点对马拉硫磷毒性的反应不同。这些结果表明, 马拉硫磷对东亚飞蝗在不同引物扩增的不同位点有选择致死作用。Nei's 遗传距离值在两个种群中都是在死亡组和存活组最高, 表明马拉硫磷对东亚飞蝗种群的遗传结构产生了一定的分化作用。

关键词: 马拉硫磷; 东亚飞蝗; 遗传结构; 微卫星引物 PCR

中图分类号: S481.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2005)03-0567-05

Genetic Differentiation in Various Populations of *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) Under Stress of Malathion

ZHENG Xian-yun¹, DANG Li¹, GUO Ya-ping¹, HE Yan-ping^{1,2}, MA En-bo¹

(1.College of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2.Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Microsatellite primer PCR technique was used to confirm the relationship between the mortality and polymorphic loci of *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) in two populations under different stress, where all individuals were acutely exposed, respectively, to two different concentrations of malathion nearly to LD₅₀ in 24 hours. It was noted that dead group of Shandongwudi population had higher polymorphism than the surviving group while, it was reversed for Tianjinbeidagang population. Different loci of same primer had different mortality under stress of malathion, namely, in Shandongwudi population only some loci such as for 33.15 core sequence and (GATA)4 showed this trend, revealing that different population had different correlative loci with malathion. Moreover, the χ^2 test showed a significant difference in correlation between the polymorphic loci and mortality in different treatment such as for 33.15 core sequence at 1 000 bp loci.. Nei's genetic distance indicated that the genetic distance between the dead group and surviving group was in the highest in two populations and the acute exposure to malathion did cause differentiation in genetic composition at population level in *Locusta migratoria manilensis*.

Keywords: genetic differentiation; locust; mortality and polymorph; Microsatellite primer PCR

飞蝗属 *Locusta* Linnaeus, 是一种洲际性农业害虫, 其分布遍及世界欧、亚、非、澳等四大洲, 全世界已

知的飞蝗有 10 个亚种, 在我国共有 3 个亚种, 即东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* (Meyen), 亚洲飞蝗 *Locusta migratoria migratoria* (Linnaeus) 和西藏飞蝗 *Locusta migratoria tibitensis* (Chen)^[1], 其中东亚飞蝗是飞蝗属中最重要的一个亚种。20 世纪 80 年代以来, 受全球异常气候变化和农业生态与环境突变的影响

收稿日期: 2004-09-18
基金项目: 中国自然科学基金资助项目 (30170612)
作者简介: 郑先云 (1974—), 女, 在读博士研究生, 研究方向为群体遗传学。
联系人: 马恩波 E-mail: maenbo2003@sxu.edu.cn

响,东亚飞蝗在我国黄、淮海地区和海南岛西南部频繁发生^[2]。

我国目前控制蝗虫为害的主要手段仍是化学药剂防治,有机磷农药以其高效性而被广泛用于多种作物上防治害虫,马拉硫磷是一种广泛使用的非内吸性低毒类有机磷农药,因其毒性低、残效期短,是被农业部所批准的无公害农药品种之一。随着化学杀虫剂的大量使用,昆虫抗药性的产生速度越来越快,抗性水平不断提高。近年来,植保部门通过实验报道了某些东亚飞蝗自然种群已对马拉硫磷产生了一定程度的抗性^[3],但东亚飞蝗的抗药性问题目前仍未引起学术界的广泛重视。近几年来,我国科学工作者对东亚飞蝗的研究逐渐从蝗区发生动态、形态结构转向生理生化、生态学及蝗灾发生成因规律等^[2]。但总体来看,我国飞蝗在种群遗传学、分子系统学及分子毒理学等方面的研究较为薄弱。在飞蝗抗性机理研究方面,国内仅马恩波、贺艳平等做了一些工作。马恩波等研究了河北黄骅、河北平山两个东亚飞蝗自然种群对马拉硫磷的敏感性差异,进一步对两种群的乙酰胆碱酯酶进行了纯化,认为东亚飞蝗黄骅种群对马拉硫磷的敏感度低于河北平山种群^[4,5]。

SSRP-PCR 是一种利用微卫星序列为单一引物进行 PCR 扩增的 DNA 分子标记技术,所选引物为 15bp-16bp,因此,相对于 RAPD 来说,引物长度较长,退火温度高,有更大的稳定性和可靠性,而且其扩增呈现高度的多态性,被广泛应用于群体遗传学及系统进化等研究。但利用分子标记进行昆虫毒理学的研究还较少,国内仅李瑄对抗阿维菌素小菜蛾酯酶等位酶进行了研究^[6],国外 William 等将不同品系小菜蛾在实验室中用马拉硫磷处理后,研究其酯酶同工酶与马拉硫磷抗药性相关的差异^[7],Heckel 等利用随机引物通过 PCR 扩增,研究抗性和敏感品系对 B.t 的敏感性和抗性,117 条引物中有 75 条产生了只在抗性 or 敏感品系才有的条带,在这 223 条带中,105 条是敏感品系,118 条在抗性品系才有,这些结果表明 PAPD 技术产生了大量的 DNA 标记可用来进行两个品系差异的连锁分析,但由于其所用的抗性和敏感品系的来源于不同的群体,很难确定这种差异是否与抗药性有关,还是由于不同群体在 DNA 水平上的差异^[8]。

为了进一步探讨农药毒性与东亚飞蝗遗传结构之间的相关性,本文选取两个杀虫剂用药背景不同的自然种群,分别采自天津北大港和山东无棣蝗区,应用 SSRP-PCR 标记技术分析检验经马拉硫磷急性处

理后,在不同选择压力下,其存活个体与死亡个体的基因型与马拉硫磷致死作用可能的相关关系。

1 材料与方法

1.1 供试农药

99.5% 的马拉硫磷 (Malathion (O,O-dimethyl-S-1,2-carboethoxy) ethylphosphorodithioate, 99.5% pure) 订购于美国 Chemical Service 公司。

1.2 样本采集及处理

山东无棣种群采自山东无棣东部野外,天津北大港种群采自天津南部,是我国东亚飞蝗发生频率最高的蝗区之一。采回后以新鲜稗草饲喂,选取活力好的五龄若虫进行生物测定实验,用微量注射器取 5 μ L 稀释好的农药注射于五龄东亚飞蝗若虫第三腹节右侧,每个浓度注射 16~24 头,雌雄各半,每组注射 3 个重复,注射丙酮作为对照,24 h 后观察死亡情况,并对死虫和活虫分别记数,进行回归分析,求得 LD₅₀ 值。无棣蝗区和北大港蝗区的 LD₅₀ 值分别为 0.85 g $\cdot$ L⁻¹ 和 2.48 g $\cdot$ L⁻¹,虫体冻存于 -80℃ 冰箱待用。

1.3 微卫星引物扩增

1.3.1 DNA 提取

东亚飞蝗 DNA 的提取按照 Sunnuck^[9]方法稍做修改,取东亚飞蝗后足股节肌肉,剪碎后在含有 0.5 mg $\cdot$ mL⁻¹ Proteinase K 和 1% SDS 的 TES 中于 56℃ 消化 8~12 h 后,用高盐法 (6 mol $\cdot$ L⁻¹ NaCl) 除去蛋白质,DNA 经异丙醇沉淀,70% 乙醇洗涤后溶于 30 μ L TE 中,DNA 的质量和浓度经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳后加以确定。

1.3.2 SSRP-PCR 扩增

三条微卫星引物参考龚鹏等^[10],分别是 33.15 核心序列,(CAC)₅ 和 (GATA)₄。引物序列和 PCR 所用的退火温度见表 1。25 μ L 体系包括:模板 DNA 20~200 ng, 10 $\times$ buffer 2.5 μ L, MgCl₂ 为 1.5~2.0 mmol $\cdot$ L⁻¹, d NTP 为 0.2 mmol $\cdot$ L⁻¹,引物为 10~30 ng, Taq DNA 聚合酶(华美公司产品)为 1U。反应条件为 94℃ 变性 5 min 后 45 个循环,即 94℃ 变性 1 min, 56℃ (不同引物不同退火温度) 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min,最后 72℃ 延伸 10 min,扩增反应在 MJ PTC-200 PCR 仪上进行,扩增产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶上恒压电泳 1.5 h,电泳缓冲液为 0.5 $\times$ TBE。

1.4 数据处理

1.4.1 遗传结构分析

以“0,1”分别表示扩增条带的有无。用 POP-

表 1 微卫星引物序列与反应条件

Table 1 Microsatellite primer PCR and sequencing reaction conditions					
引物名称	引物序列	退火温度/℃	Mg ²⁺ 浓度 (MgCl ₂) /mmol · L ⁻¹	引物浓度/ng · 25 μ L ⁻¹	模板浓度/ng · 25 μ L ⁻¹
33.15core sequence	AGAGGTGGGCAGGTG	56	2.0	30	200
(CAC) ₅	CACCACCACCACCAC	57	1.5	10	20
(GATA) ₄	GATAGATAGATAGATA	40	1.5	20	20

GENE3.2 软件分析初始组、存活组和死亡组的多态位点的百分数 (P),Shannon 信息指数 (I) 和 Nei’ s 基因多样性指数 (H),遗传距离 (D)。

1.4.2 扩增片段与死亡率之间的相关性检验

对东亚飞蝗微卫星引物扩增的多态性位点上有条带的记为基因型 A,无条带的为 B,对不同位点上的基因型类型与死亡率进行 2 × 2 列联表 x² 检验,以了解该扩增片段与马拉硫磷致死作用之间的相关性,在统计时每个基因型为一组,每组个体数视为重复。

2 结果与分析

2.1 东亚飞蝗经马拉硫磷处理后的遗传结构研究

东亚飞蝗初始样本及经马拉硫磷处理后存活组

与死亡组的多态位点百分数 (P),Shannon 信息指数 (I)、Nei’ s 基因多样性指数 (H)见表 2。由表 2 可知,无棣种群死亡组的多态性明显高于存活组。多态位点的百分数 (P),Shannon 信息指数 (I) 和 Nei’ s 基因多样性 (H) 指数分别为 0.851 1/0.957 4,0.312 9/0.341 9 和 0.191 0/0.208 7; 而北大港种群存活组的多态性高于死亡组,三个参数分别为 0.963 0/0.944 4,0.371 0/0.345 6,0.227 5/0.209 3。从这些数据也可以看出北大港群体的多态性高于无棣群体。从遗传距离的大小来讲,在两个种群中,死亡组与存活组的遗传距离最大,分别为 0.006 4 和 0.002 8;在无棣种群中存活组与初始组之间的遗传距离最小,为 0.001 3;而在北大港种群中,则是死亡组和初始组之间的遗传距离

表 2 马拉硫磷处理后各组遗传多样性分析

Table 2 Genetic variability in two Locusta migratoria manilensis populations treated with malathion

分组	多态位点的百分数 (P)		Shannon 信息指数(I)		Nei's 基因多样性指数 (H)	
	山东无棣	天津北大港	山东无棣	天津北大港	山东无棣	天津北大港
存活组	0.851 1	0.963 0	0.312 9	0.371 0	0.191 0	0.227 5
死亡组	0.957 4	0.944 4	0.341 9	0.345 6	0.208 7	0.209 3
初始组	0.978 7	0.978 7	0.337 8	0.360 8	0.204 1	0.219 2

表 3 马拉硫磷处理后,死亡组、存活组及初始组之间的 Nei’ s 遗传距离

Table 3 Nei’ s genetic distance among different groups (dead group, surviving group and initial group) treated with malathion

处理组	存活组	死亡组	初始组
存活组		0.002 8*	0.000 8*
死亡组	0.006 4**		0.000 6*
初始组	0.001 3**	0.002 2**	

注:* 为天津北大港种群;** 为山东无棣种群。

最小为 0.000 6 (表 3)。

2.2 多态位点与马拉硫磷致死性的关系

用接近于 LD₅₀ (0.85 g · L⁻¹) 的马拉硫磷 (0.8 g · L⁻¹ 与 1.12 g · L⁻¹) 处理东亚飞蝗无棣种群个体各 61, 64 头, 注射 24 h 后死亡率分别为 43.0% 与 52.9%, 44 个多态位点上各基因型死亡率及其死亡率差异 x² 检验表明, 引物 (CAC)₅ 所扩增的 6 个位点上存活组与死亡组基因型频率无显著性差异, 均未表现出显著的农药 - 基因型相关性 (P > 0.05), 仅在 1.12 g · L⁻¹

处理组中, 33.15 核心序列的 1 000 bp 和 1 400 bp 位点, 引物 (GATA)₄ 的 1 150 bp 位点有显著差异 (见表 4, 表 5)。在山东无棣种群中, 引物 (GATA)₄ 的 1.12 g · L⁻¹ 处理组中, 在 300 bp 和 1 400 bp 位点均为存活组的个体扩增出条带; 引物 (GATA)₄ 的 1.12 g · L⁻¹ 的处理中在 1 150 bp 和 750 bp 位点均是死亡组中有个体扩增出条带, 见表 5。

用接近于 LD₅₀ (2.48 g · L⁻¹) 的 2.1 与 3.2 g · L⁻¹ 分别处理东亚飞蝗天津北大港种群个体 58、64 头。注射 24 h 后死亡率分别为 47.6% 和 52.6%, 52 个多态位点中仅在 3.2 g · L⁻¹ 处理的 33.15 核心序列的 1 500 bp 位点和 (CAC)₅ 的 900 bp 位点表现出显著的农药 - 基因型相关性。在引物 (CAC)₅ 的 3.2 g · L⁻¹ 处理中, 在 1 300 bp 位点只在存活组中的个体扩增出条带。

3 讨论

本文选用的东亚飞蝗采自山东无棣和天津北大港区, 两蝗区都属于滨海蝗区, 具有相同的生态特点

表 4 马拉硫磷处理东亚飞蝗后,与马拉硫磷致死性相关的位点在不同处理下的比较

Table 4 Correlative loci mortality with different treatments with malathion in two populations								
种群名称	山东无棣		山东无棣		天津北大港		天津北大港	
位点	33.15-1 000 bp		33.15-1 400bp		33.15-1 500bp		(CAC) ₅ -900bp	
处理浓度/g · L ⁻¹	0.8	1.12	0.8	1.12	2.1	3.2	2.1	3.2
P	0.635 3	0.021 9	0.808 5	0.017 3	0.925 1	0.027 8	0.962 9	0.026 4
x ²	0.224 9	1.254 1	0.058 7	5.661 5	0.008 8	4.841 2	0.002 2	4.930 3

表 5 马拉硫磷处理后,死亡组/存活组特有带与马拉硫磷致死性的相互关系

Table 5 Relationship between specific bands in surviving group and dead group and mortality treated with malathion										
分组	存活组				死亡组					
种群名称	山东无棣				天津北大港		山东无棣			
位点	(GATA) ₄ -1 400bp		(GATA) ₄ -300bp		(CAC) ₅ -1 300bp		(GATA) ₄ -1 150bp		33.15-750bp	
处理浓度/g · L ⁻¹	0.8	1.12	0.8	1.12	2.1	3.2	0.8	1.12	0.8	1.12
存活数/死亡数	5/2	4/0	3/0	3/0	1/1	3/0	—	0/4	0/1	0/4
P	0.269 0	0.053 9	0.086 6	0.098 5	0.078 0	0.974 3	—	0.024 6	0.268 0	0.073 2
x ²	1.221 8	3.714 3	2.937 1	2.728 9	3.105 9	3.105 9	—	5.055 6	1.268 7	3.209 8

且地理位置也比较相近。山东无棣地处山东省最北部,蝗区主要分布在东部及东北部的沿海乡镇,属东亚飞蝗偶发区,马拉硫磷在该蝗区的使用频率较低。北大港蝗区是天津现有最大的蝗区,也是我国的重点蝗区。由于长期使用有机磷农药进行蝗虫防治,当地植保部门发现有机磷农药如马拉硫磷在防治过程中使用剂量不断加大,但实际的防治效果却有所降低,表明某些东亚飞蝗自然种群已经对马拉硫磷产生了一定程度的抗性。贺艳萍(博士论文)通过生物测定也发现山东无棣种群相对于天津北大港种群对马拉硫磷的敏感性较高。不同种群之间马拉硫磷选择压力的不同已造成不同种群对马拉硫磷的敏感程度产生的差异^[1]。

现代遗传学理论认为,抗性的产生几乎都是遗传与环境因素相互作用的结果^[2],就某种害虫而言,其对农药的抗性程度取决于该害虫种群的遗传结构特征^[3],而抗性遗传基础的研究对于抗性监测和制定合理的防治策略起着重要的作用。根据实验所得结果,由多态位点的百分数(P)、Shannon 信息指数(I)和 Nei’s 基因多样性指数(H)可以看出,天津北大港种群有较高的遗传多样性,使该种群能够更好适应较高的农药选择压力下的环境变化,而较低的遗传多样性则会降低群体适应环境变化的能力^[4]。因此,从另一方面讲,有机磷杀虫剂如马拉硫磷的防治对山东无棣种群的防治效果更为合适。Nei’s 遗传距离值在两个种群中都是在死亡组和存活组之间最高,表明马拉硫磷对东亚飞蝗种群的遗传结构产生了一定的分化作用。各多态位点与马拉硫磷致死性相关性检测表明:

第一,相同引物的不同位点对马拉硫磷的敏感性不同。例如在山东无棣种群中仅在 33.15 核心序列与 (GATA)₄ 的某些位点与马拉硫磷的致死性存在相关性;不同种群对马拉硫磷致死性存在相关性的位点不同,在山东无棣种群仅在 33.15 核心序列的 1 000 bp 和 1 400 bp 位点与马拉硫磷致死性存在相关性;而在天津北大港种群则是 (CAC)₅ 引物的 900 bp 位点和 33.15 的 1 500 bp 位点存在相关性。第二,不同处理的东亚飞蝗在同一引物扩增出的同一位点对马拉硫磷毒性的反应不同。例如在山东无棣种群的 33.15 核心序列在 1.12 g·L⁻¹ 处理的 1 000 bp 位点,对马拉硫磷存在显著相关性而在 0.8 g·L⁻¹ 的处理中却不存在;在天津北大港种群中也存在这种现象。

这些结果表明:马拉硫磷对东亚飞蝗在不同引物扩增的不同位点有选择致死作用(表 4)。

本文应用 SSRP 技术研究东亚飞蝗在不同农药使用背景下种群之间的遗传分化现象,是基于对大量个体分析的统计学结果,是一种统计上的相关关系,因此不能单纯从电泳结果来判别存活个体和死亡个体的特征性谱带。某些引物的某几个位点上仅在存活组或是死亡组中有条带出现,但由于本实验为急性毒性实验,所以严格意义上来讲,某些为存活组(或是死亡组)所特有特征片段不能说某个片段为抗性或是敏感品系所特有,但是可能作为一种东亚飞蝗不同种群对农药抗性水平评估的标记。

参考文献:

[1] 朱恩林. 中国东亚飞蝗发生与治理[M]. 北京: 中国农业出版社,

1999. 3–558.
- [2] 陈永林. 蝗虫灾害的特点、成因和生态学治理[M]. 生物学通报, 2000, 35(7):1–5.
- [3] 杨红军, 王东升, 张立顺, 谢建军. 东亚飞蝗对马拉硫磷抗性研究初报[J]. 植保技术与推广, 2002, 22(8): 11–12,16.
- [4] Ma E B, He Y P, Zhu K Y. Comparative studies of acetylcholinesterases purified from two field populations of the oriental migratory locust (*Locusta migratoria manilensis*): implication of insecticide resistance [J]. *Pestic Biochem Physy*, 2004, 78, 67–77.
- [5] He Y P, Ma E B, Zhu K Y. Characterications of general esterases in relation to malathion susceptibility in two field populations of the proriental migratory locust[J]. *Pestic Biochem Physy*, 2004,78, 103–113.
- [6] 李 瑄, 乔传令. 抗阿维菌素小菜蛾酯酶等位酶的研究. 走向 21 世纪的中国昆虫学[M]. 北京:中国科学出版社, 2000.79–381.
- [7] William Can–Jen Maa, Sin–Chung Liao. Culture–dependent variation in esterase isozymes and malathion susceptibility of Diamondback moth[J]. *Phitella Xylostella L Zool Stud*, 2000, 39(4): 375–386.
- [8] Heckel D G, Galan L J, Tabashink et al. Randomly amplified polymorphic DNA differentiation between strains of diamondback moth(*Lepidoptera: plutellidae*) susceptible or resistance to *Bacillus thuiynylensis* [J]. *Ann Entomol Soc Am*, 1995, 88 (4): 531–537.
- [9] Sunnucks, P, Hales D K. Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I – II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera:Aphididae) [J]. *Mol Biol Evol* , 1996,13, 510–524.
- [10] 龚 鹏, 杨效文, 张孝羲, 刘向东, 陈晓峰. 棉蚜(*Aphis gossypii*)种群寄主分化和季节分化的微卫星引物 PCR 研究[J]. 生态学报, 2001, 21(5): 765–771.
- [11] 贺艳萍. 中国重要蝗区东亚飞蝗有机磷杀虫剂抗性生化机制研究(博士论文)[D]. 2004.
- [12] 唐振华, 吴世雄. 昆虫抗药性的遗传与进化[M]. 上海:上海科学技术文献出版社,2000.99–323.
- [13] Guedes R N S, Kambhampati S, Dovers B A. Allozyme variation among Brazilian and U. S. populations of *Rhyzopertha dominica* resisitant to insecticides[J]. *Entomologia Experimental is et Applicata*, 1997,84:49–57.
- [14] Ayala F J, Kiger J A. Modern genetics, 2nd(edu). Benjamin–cumings, Menlo park, USA. 1984.