

doi: 10.3969/j.issn.1674-0858.2015.03.16

# DNA 条形码快速鉴定广州木槿蚜虫

汪珍春<sup>1</sup>, 邓其芬<sup>1</sup>, 陈诗颖<sup>1</sup>, 郑毅胜<sup>1</sup>, 姜立云<sup>2\*</sup>

(1. 广州大学生命科学学院, 广州 510006; 2. 中国科学院动物进化与系统学重点实验室, 北京 100101)

**摘要:** 为快速、准确鉴定木槿蚜虫, 本文在广州市 30 个采样点采集了木槿蚜虫样本 64 份, 利用 DNA 条形码技术获得了 64 份线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I (*COI*) 基因的 658 bp 序列, 同时利用形态鉴定和 DAN 条形码鉴定确定其中共包括 5 种蚜虫, 棉蚜 *Aphis gossypii* Glover、绣线菊蚜 *Aphis spiraeicola* Patch、苹果蚜 *Aphis pomi* de Geer、月季长管蚜 *Sitobion rosivorum* (Zhang) 和桃蚜 *Myzus persicae* (Sulzer)。所有样品的种内平均遗传距离为 0.30% (0~2.30±0.36%), 种间平均遗传距离为 9.00% (3.30%~10.90±1.22%)。邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建的系统发育树显示来自 30 个采样点木槿上的 5 种蚜虫分别聚为一支, 支持率达 99%。所获 DNA 条形码对指导木槿的蚜虫防治有一定的指导意义。

**关键词:** 蚜虫; DNA 条形码; *COI*; 快速鉴定; 木槿

中图分类号: Q969; S433.39

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2015) 03-0583-08

## Rapid identification of aphids on *Hibiscus syriacus* Linn. in Guangzhou based on DNA barcoding

WANG Zhen-Chun<sup>1</sup>, DENG Qi-fen<sup>1</sup>, CHEN Shi-Ying<sup>1</sup>, ZHENG Yi-Sheng<sup>1</sup>, JIANG Li-Yun<sup>2\*</sup>

(1. School of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China; 2. Key Laboratory of Zoological Systematics and Evolution, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract:** In order to identify the aphids rapidly and accurately in flower pest control, 64 aphid species on *Hibiscus syriacus* Linn samples were gathered in 30 places from Guangzhou City. The 658 bp *COI* (mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I) sequences of 64 samples were amplified using universal barcoding primers, which belong to 5 species, *Aphis gossypii* Glover, *Aphis spiraeicola* Patch, *Aphis pomi* de Geer, *Sitobion rosivorum* (Zhang) and *Myzus persicae* (Sulzer). The results showed that the average intraspecies sequence divergences of *COI* is 0.30% (0~2.30±0.36%), while the average interspecies sequence divergences is 9.00% (3.30%~10.90±1.22%). Neighbor-joining phylogenetic tree was built on the *COI* gene sequences, and the results indicated that the same species was clustered in the same branch, approval rate is 99%. It suggested that DNA barcoding (*COI* gene sequences) is applicable in the aphid identification from flowers.

**Key words:** aphid; DNA barcoding; *COI*; rapid identification; *Hibiscus syriacus* Linn.

木槿 *Hibiscus syriacus* Linn. 隶属锦葵科 Malvaceae 木槿属 *Hibiscus* Linn. 的常绿灌木或小乔木, 又称赤槿、佛桑、扶桑等, 在中国岭南一带

被俗称为大红花, 是广州市的常见绿化植物。木槿在春、秋两季非常容易受到蚜虫的威胁, 嫩枝、叶片、花蕾是其主要寄生部位, 常造成叶面卷缩,

基金项目: 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); 国家级大学生创新训练项目 (201311078013)

作者简介: 汪珍春, 女, 1966 年生, 广东人, 学士, 副教授, 从事花卉蚜虫条形码研究, E-mail: wzc\_laoshi@aliyun.com

\* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: jiangliyun@ioz.ac.cn

收稿日期 Received: 2014-07-28; 接受日期 Accepted: 2015-01-27

花蕾不开放甚至脱落, 蚜虫排泄的蜜露还会污染叶面和枝梢, 造成烟霉病, 影响木槿的生长和美观 (Ellis *et al.*, 1998)。

蚜虫类 Aphidinea 昆虫隶属于昆虫纲 Insecta 半翅目 Hemiptera, 世界已知 5000 余种 (Favret, 2013)。中国蚜虫类资源丰富, 已知种类有 1100 余种 (Liu *et al.*, 2009)。蚜虫体型很小, 形态特征特化或退化, 具有复杂的多型现象, 有效的形态鉴别特征较少。通常每个蚜虫物种具有有翅孤雌型和无翅孤雌型 2 个型, 在具有全周期生活史的蚜虫甚至多达 5–8 个型, 包括干母、干雌、有翅孤雌型、无翅孤雌型、产雌性母、产雄性母、雌性蚜和雄性蚜 (张广学和钟铁森, 1983)。所采样本主要是无翅孤雌型和少量的有翅孤雌型。此外, 许多蚜虫还有多种体色型, 例如根据本研究发现棉蚜 *Aphis gossypii* Glover 的体色有白色、白绿色、黄色、粉绿色、墨绿色和黑色等。

DNA 条形码 (DNA barcoding) 是利用线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I (Cytochrome oxidase subunit I, *COI*) 作为动物通用的物种鉴定标记 (Hebert *et al.*, 2003), 通过对基因序列差异的分析可以将所有物种进行快速鉴定, 不受物种形态鉴定知识缺乏的限制。DNA 条形码技术在许多动物类群中得到了应用, 积累了大量的数据。在蚜虫物种鉴定方面也做了大量的尝试, 结果表明 *COI* 基因可以很好地区分大部分物种, 在蚜虫鉴定中具有显著的优势和应用价值 (Wang and Qiao, 2009; Pelletier *et al.*, 2012; Rebijith *et al.*, 2013; 汪珍春等, 2013; Armelle *et al.*, 2014)。

城市绿化植物上蚜虫种类快速、准确的鉴定对于杀虫剂种类的选取, 以及抗蚜虫品系的筛选都具有重要的指导作用, 然而, 仅依据形态特征开展的蚜虫物种鉴定工作中的错误鉴定和同物异名现象时有发生, 而且需要具有扎实的专业知识与丰富经验的分类学者才能完成。因此, 本研究采集了广州市越秀区、天河区、海珠区和大学城木槿上的蚜虫样品共计 64 份, 通过扩增和分析其 *COI* 基因, 构建系统发育树, 以期对广州市木槿蚜虫物种的快速、准确鉴定提供依据, 为植保工作提供数据支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

研究用蚜虫样品均采自广州市木槿, 共计 64 份样品 (表 1), 涉及 3 属 5 种。所采集的样品分别浸泡于 75% 和 95% 酒精中。其中, 75% 酒精浸泡标本用于形态鉴定, 95% 酒精浸泡标本用于分子实验。标本由中国科学院动物研究所乔格侠研究员鉴定, 并保存于中国科学院动物研究所国家动物博物馆 (中国, 北京) 和广州大学生命科学学院。

### 1.2 粗提 DNA、PCR 扩增、测序以及序列比对分析

DNA 的粗提取: 利用 TakaRa 公司的 MightyAmp DNA Polymerase Ver. 2 试剂盒对样品进行 DNA 粗提。该试剂盒由 MightyAmp DNA Polymerase (1.25U/ $\mu$ L) 和 MightyAmp Buffer Ver. 2 ( $Mg^{2+}$ , dNTP plus) 组成。本实验选取浸泡于 95% 酒精中的体型较大的单个蚜虫虫体, 吸干虫体表面酒精后, 用  $dH_2O$  漂洗 3 次, 浸泡过夜。次日更换  $dH_2O$  后, 保留约 3  $\mu$ L 的  $dH_2O$ , 用研磨杵将虫体研碎, 吸取上清液, 即得到单个蚜虫 DNA 粗提液。

PCR 引物及扩增条件: 扩增引物为通用引物 LEP-F (ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG) 和 LEP-R (AAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA), 用于扩增 *COI* 基因 3' 端约 700 bp 的片段。反应条件为 98 $^{\circ}C$  变性 2 min, 98 $^{\circ}C$  变性 10 s, 54 $^{\circ}C$  退火 15 s, 68 $^{\circ}C$  延伸 1 min, 35 个循环。68 $^{\circ}C$  最终延伸 10 min。扩增体系为 20  $\mu$ L, 包括: MightyAmp Buffer Ver. 2 10  $\mu$ L, primer1 1  $\mu$ L, primer2 1  $\mu$ L, DNA 粗提液 2  $\mu$ L, MightyAmp DNA Polymerase 0.5  $\mu$ L,  $dH_2O$  5.5  $\mu$ L。

扩增产物测序: PCR 产物纯化后, 利用 ABI 3730xl 96-capillary DNA 分析仪 (Applied Biosystems, USA, 上海美吉生物医药科技有限公司广州分公司) 进行双向测序。

序列比对、分析: 通过 Seqman 5.01 (DNASTAR, Inc. 1996) 软件对双向测序结果进行拼接、校对、切去引物得到 658 bp; 应用 DNAMAN 5.2.2 (Lynnon Biosoft, Quebec, Canada) 软件检验是否能正确翻译蛋白质以确保序列的正确性; 在 GENBANK 中进行 BLAST 确定所获序列

为蚜虫序列以排除其他物种的干扰; 使用 MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2007) 对序列进行多重比对。通过 DAMBE 程序 (Xia and Xie, 2001) 进行序列饱和性分析, 以转换、颠换为纵轴, 以 TN93 模型 (Tamura and Nei, 1993) 校正的距离为横轴做散点图。如果这些点随序列间距离的增大而呈线性分布, 说明序列间的替换没有达到饱和, 这些序列可以用于后续的分析; 利用 MEGA 5.0 查看核酸组成; 基于 K2P 模型 (Kimura - 2 - parameter distance, Kimura, 1980), 计算序列差异, 构建邻接树 (Neighbour - Joining tree, NJ tree), 并

对各分支节点进行 Bootstrap 检验 (检测 1000 次, 每次检测随机加样重复 100 次); 应用 EXCEL 软件 (Microsoft Office Excel 2003) 计算各差异频次, 绘制频次图。

## 2 结果与分析

### 2.1 样品鉴定结果

所获 64 份蚜虫样本经形态学和分子学鉴定, 共涉及 3 属 5 种, 见表 1。

表 1 研究所用蚜虫样品信息

Table 1 List of aphid samples used in this study

属 Genus	种 Species	采集地点 Location	采集日期 Date	生态位 Locality	活体体色 Color in life	标本号 No. of samples	序列号 No. of sequences
蚜属	棉蚜 <i>A. gossypii</i> Glover	越秀区 水荫路	2012 - 01 - 25	花蕾 散居	墨绿色	WZC041	KM115482
Aphis Linnaeus	棉蚜 <i>A. gossypii</i> Glover	越秀区 水荫路	2012 - 01 - 25	花蕾 散居	黄色	WZC042	KM115483
	棉蚜 <i>A. gossypii</i> Glover	越秀区 水荫路	2012 - 01 - 25	叶背 散居	黄色	WZC043	KM115484
	棉蚜 <i>A. gossypii</i> Glover	越秀区 水荫路	2012 - 01 - 25	花蕾 散居	墨绿色	WZC044	KM115485
	棉蚜 <i>A. gossypii</i> Glover	越秀区 水荫路	2011 - 11 - 17	花蕾 散居	浅绿	WZC027	KM115481
	棉蚜 <i>A. gossypii</i> Glover	越秀区 广州城市职业学院	2012 - 11 - 15	叶背 散居	墨绿色	YYQ052	KM115500
	棉蚜 <i>A. gossypii</i> Glover	越秀区 广州城市职业学院	2012 - 11 - 15	叶面 散居	墨绿色	YYQ053	KM115501
	棉蚜 <i>A. gossypii</i> Glover	越秀区 广州城市职业学院	2012 - 11 - 15	叶柄 散居	深绿色	YYQ054	KM115502
	棉蚜 <i>A. gossypii</i> Glover	越秀区 广州城市职业学院	2012 - 11 - 15	叶背 散居	深黄色	YYQ055	KM115503
	棉蚜 <i>A. gossypii</i> Glover	越秀区 广州城市职业学院	2012 - 11 - 15	叶背 散居	深绿色	YYQ056	KM115504
	棉蚜 <i>A. gossypii</i> Glover	越秀区 广州城市职业学院	2012 - 11 - 15	茎 散居	黑色	YYQ059	KM115505
	棉蚜 <i>A. gossypii</i> Glover	越秀区 白云山麓湖景区	2012 - 11 - 15	叶背 散居	黑色	YYQ060	KM115506
	棉蚜 <i>A. gossypii</i> Glover	越秀区 白云山麓湖景区	2012 - 11 - 15	叶背 散居	黄色	YYQ061	KM115507
	棉蚜 <i>A. gossypii</i> Glover	越秀区 广州城市职业学院	2012 - 11 - 15	茎 散居	黄色	YYQ062	KM115508
	棉蚜 <i>A. gossypii</i> Glover	天河区 天河区体育馆	2012 - 02 - 24	叶背 散居	粉绿色	ZZM007	KM115510
	棉蚜 <i>A. gossypii</i> Glover	天河区 天河区体育馆	2012 - 02 - 24	叶背 散居	黑色	ZZM007 - 1	KM115509
	棉蚜 <i>A. gossypii</i> Glover	天河区 体育西路	2012 - 02 - 24	叶背 散居	草绿色	ZZM008 - 1	KM115511
	棉蚜 <i>A. gossypii</i> Glover	天河区 天河区体育馆	2012 - 02 - 24	茎 散居	黑色	ZZM010	KM115514
	棉蚜 <i>A. gossypii</i> Glover	天河区 天河区体育馆	2012 - 02 - 24	茎 散居	粉绿色	ZZM010 - 1	KM115513
	棉蚜 <i>A. gossypii</i> Glover	天河区 暨南大学	2012 - 02 - 26	叶背 散居	黑色	ZZM022	KM115515
	棉蚜 <i>A. gossypii</i> Glover	天河区 暨南大学	2012 - 02 - 26	花瓣 散居	黑色	ZZM025	KM115516
棉蚜 <i>A. gossypii</i> Glover	天河区 暨南大学	2012 - 03 - 01	叶背 散居	粉绿色	ZZM033	KM115517	
棉蚜 <i>A. gossypii</i> Glover	天河区 燕岭路燕侨大厦楼下	2012 - 03 - 24	叶背 散居	粉绿色	ZZM040	KM115518	
棉蚜 <i>A. gossypii</i> Glover	天河区 中山大道西棠安宾馆前	2012 - 03 - 17	叶背 散居	粉绿色	ZZM061	KM115519	

(续上表)

属 Genus	种 Species	采集地点 Location	采集日期 Date	生态位 Locality	活体体色 Color in life	标本号 No. of samples	序列号 No. of sequences
棉蚜	<i>A. gossypii</i> Glover	天河区 中山大道中盈江广场	2013-01-17	花瓣 散居	黑色	ZZM080	KM115521
棉蚜	<i>A. gossypii</i> Glover	天河区 中山大道中盈江广场	2013-01-17	花瓣 散居	黑色	ZZM080-1	KM115520
棉蚜	<i>A. gossypii</i> Glover	天河区 广东迎海集团有限公司	2013-01-17	花瓣 散居	黑色	ZZM081	KM115526
棉蚜	<i>A. gossypii</i> Glover	天河区 中山大道中	2013-01-17	茎 散居	黑色	ZZM082	KM115523
棉蚜	<i>A. gossypii</i> Glover	天河区 中山大道中	2013-01-17	花瓣 散居	深绿色	ZZM082-1	KM115522
棉蚜	<i>A. gossypii</i> Glover	天河区 公交站珠村站	2013-01-17	花瓣 散居	黑色	ZZM084	KM115524
棉蚜	<i>A. gossypii</i> Glover	天河区 广东迎海集团有限公司	2013-01-17	茎 散居	棕褐色	ZZM086	KM115525
棉蚜	<i>A. gossypii</i> Glover	天河区 车陂路和厨酸菜鱼前	2013-01-17	叶背 散居	深绿色	ZZM087	KM115527
棉蚜	<i>A. gossypii</i> Glover	天河区 天河东路	2012-02-04	叶背 散居	黄色	ZZM091-1	KM115528
棉蚜	<i>A. gossypii</i> Glover	越秀区 华园路 68 号	2012-02-17	花叶 叶背散居	黄绿色	YYQ014	KM115498
棉蚜	<i>A. gossypii</i> Glover	越秀区 华园路 68 号	2012-02-17	花叶 芽 群居	黄绿色	YYQ015	KM115499
棉蚜	<i>A. gossypii</i> Glover	海珠区 晓港公园外	2012-02-24	叶背 散居	浅黄色	XJY028	KM115486
棉蚜	<i>A. gossypii</i> Glover	海珠区 南武实验中学	2012-03-11	叶背 散居	绿黄白	XJY034	KM115487
棉蚜	<i>A. gossypii</i> Glover	海珠区 新港西 155 号	2012-03-17	叶背 散居	白色	XJY039	KM115488
棉蚜	<i>A. gossypii</i> Glover	海珠区 前进路	2012-11-23	茎 散居	墨绿	XJY085	KM115490
棉蚜	<i>A. gossypii</i> Glover	海珠区 前进路	2012-11-23	叶背 散居	浅黄色	XJY086	KM115491
棉蚜	<i>A. gossypii</i> Glover	海珠区 江南西柯达照相铺	2013-02-04	叶背 散居	墨绿色	XJY105	KM115494
棉蚜	<i>A. gossypii</i> Glover	海珠区 江南西柯达照相铺	2013-02-04	茎 散居	褐绿色	XJY105-2	KM115492
棉蚜	<i>A. gossypii</i> Glover	海珠区 南海东方广场	2013-02-24	叶背 散居	墨绿色	XJY113	KM115497
棉蚜	<i>A. gossypii</i> Glover	海珠区 南海东方广场	2013-02-24	叶腹 散居	墨绿色	XJY113-2	KM115495
棉蚜	<i>A. gossypii</i> Glover	海珠区 南海东方广场	2013-02-24	叶背 散居	透明黄	XJY113-3	KM115496
棉蚜	<i>A. gossypii</i> Glover	大学城 中山大学校区	2012-03-15	叶背 散居	草绿色	LY079	KM115474
棉蚜	<i>A. gossypii</i> Glover	大学城 华南师范大学校区	2012-03-22	叶背 散居	黑色	LY088	KM115475
棉蚜	<i>A. gossypii</i> Glover	大学城 广东外语外贸大学校区	2012-03-28	叶背 散居	深绿色	LY103	KM115477
棉蚜	<i>A. gossypii</i> Glover	大学城 星海音乐学院校区	2012-04-03	叶背 散居	黑色有翅	LY121	KM115479
棉蚜	<i>A. gossypii</i> Glover	天河区 天河东路	2012-02-04	叶背 散居	黄绿色	ZZM091	KM115529
棉蚜	<i>A. gossypii</i> Glover	大学城 华南师范大学校区	2012-03-22	嫩芽 散居	粉绿色	LY092	KM115476
棉蚜	<i>A. gossypii</i> Glover	大学城 星海音乐学院校区	2012-04-03	芽 茎 散居	粉绿色	LY120	KM115478
棉蚜	<i>A. gossypii</i> Glover	大学城 广州大学校区	2012-04-05	叶背 散居	粉绿色	LY122	KM115480
苹果蚜	<i>A. pomi</i> de Geer	大学城 广州工业大学校区	2012-03-09	叶背 散居	粉绿色	LY073	KM115471
苹果蚜	<i>A. pomi</i> de Geer	大学城 广州工业大学校区	2012-03-09	叶背 散居	粉绿色	LY074	KM115468
苹果蚜	<i>A. pomi</i> de Geer	大学城 广州工业大学校区	2012-03-09	叶背 散居	粉绿色	LY075	KM115472
苹果蚜	<i>A. pomi</i> de Geer	大学城 广州工业大学校区	2012-03-09	叶背 散居	粉绿色	LY076	KM115473

(续上表)

属 Genus	种 Species	采集地点 Location	采集日期 Date	生态位 Locality	活体体色 Color in life	标本号 No. of samples	序列号 No. of sequences
	绣线菊蚜 <i>A. spiraecola</i> Patch	天河区 体育西路	2012-02-24	叶背 散居	黑色	ZZM008	KM115512
长管蚜属	月季长管蚜 <i>Sitobion rosivorum</i> (Zhang)	大学城 广东外语外贸大学 校区	2012-03-28	叶腹面 散居	深绿色	LY099	KM115470
<i>Sitobion</i> Mordvilko	月季长管蚜 <i>Sitobion rosivorum</i> (Zhang)	大学城 广东外语外贸大学 校区	2012-03-28	叶背 群居	深绿色	LY102	KM115469
	月季长管蚜 <i>Sitobion rosivorum</i> (Zhang)	大学城 广东外语外贸大学 校区	2014-04-15	叶背 群居	深绿色	YXM059	KM115530
瘤蚜属	桃蚜 <i>M. persicae</i> (Sulzer)	海珠区 中国电信工业大道 南店	2012-04-03	叶背 散居	浅绿色	XJY046	KM115489
	桃蚜 <i>M. persicae</i> (Sulzer)	海珠区 江南西柯达照相铺	2013-02-04	叶背 散居	褐绿色	XJY105-3	KM115493
	桃蚜 <i>M. persicae</i> (Sulzer)	海珠区 江南西柯达照相铺	2014-04-20	叶背 散居	浅绿色	CSY065	KM115529

## 2.2 COI 序列特征分析

实验获得全部样品的 64 条序列, 经 MEGA 比对后每个序列得到 649 bp, 编码 216 个氨基酸。碱基平均含量为 40.9% T, 14.0% C, 34.8% A, 10.3% G。A + T 含量为 75.7%, C + G 含量为 24.3%, 存在明显的 A、T 碱基偏好性。其中, 有保守位点 521 个, 可变位点 128 个, 简约位点 110 个, 单个突变位点 18 个。

## 2.3 COI 序列饱和性分析

运用 DAMBE 软件对 64 个序列进行饱和性分析, 结果显示 (图 1), 序列间转换、颠换数随距离增加呈线性增长趋势, 未表现出饱和态势, 因此所有数据都可被用于后续分析。

## 2.4 NJ 树结构分析

运用邻接法和 K2P 模型构建了所有样本序列的 NJ 树 (图 2)。结合系统发育树与形态鉴定的结果, 共鉴定出木槿植物上蚜虫 5 种, 分属 2 个亚科, 即蚜亚科 Aphidinae (3 种) 和长管蚜亚科 Macrosiphinae (2 种)。

从 NJ 树可以看出, 所有同一物种的样品都有效地聚为一支, 支持率达 99%。仅具有一个样品的物种也与其他物种明显地区分开。

## 2.5 遗传距离分析

基于 K2P 模型, 计算了 64 条 COI 序列间的平均遗传距离为 2.95%, 标准差为 5.45%, 距离范围为 0 - 10.90%。主要集中在 0 - 1.20% 和 6.60% - 11.00% 范围内, 种内遗传距离和种间遗

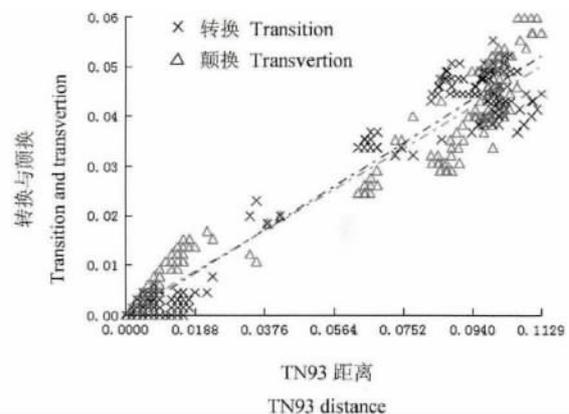


图 1 基于 649 bp 线粒体基因 COI 的序列饱和性分析散点图  
Fig. 1 Saturation plots for the mitochondrial COI sequences with 649 bp

传距离之间形成明显的“Barcoding gap” (图 3)。种内遗传距离为 0 - 2.30%, 平均距离为 0.30%, 标准差为 1.17%。选取分别有 3 个以上样品的 4 个物种, 计算了每个物种的平均种内遗传距离 (表 2), 桃蚜的种内遗传距离最小, 为 0; 苹果蚜的种内遗传距离最大, 为 1.90%。种间遗传距离为 3.30% - 10.90%, 平均遗传距离为 9.00%, 标准差为 3.81%。5 个物种间的平均遗传距离表明 (表 3), 苹果蚜和绣线菊蚜之间的遗传距离最小, 为 3.68%; 苹果蚜和月季长管蚜之间的遗传距离最大, 为 10.15%。

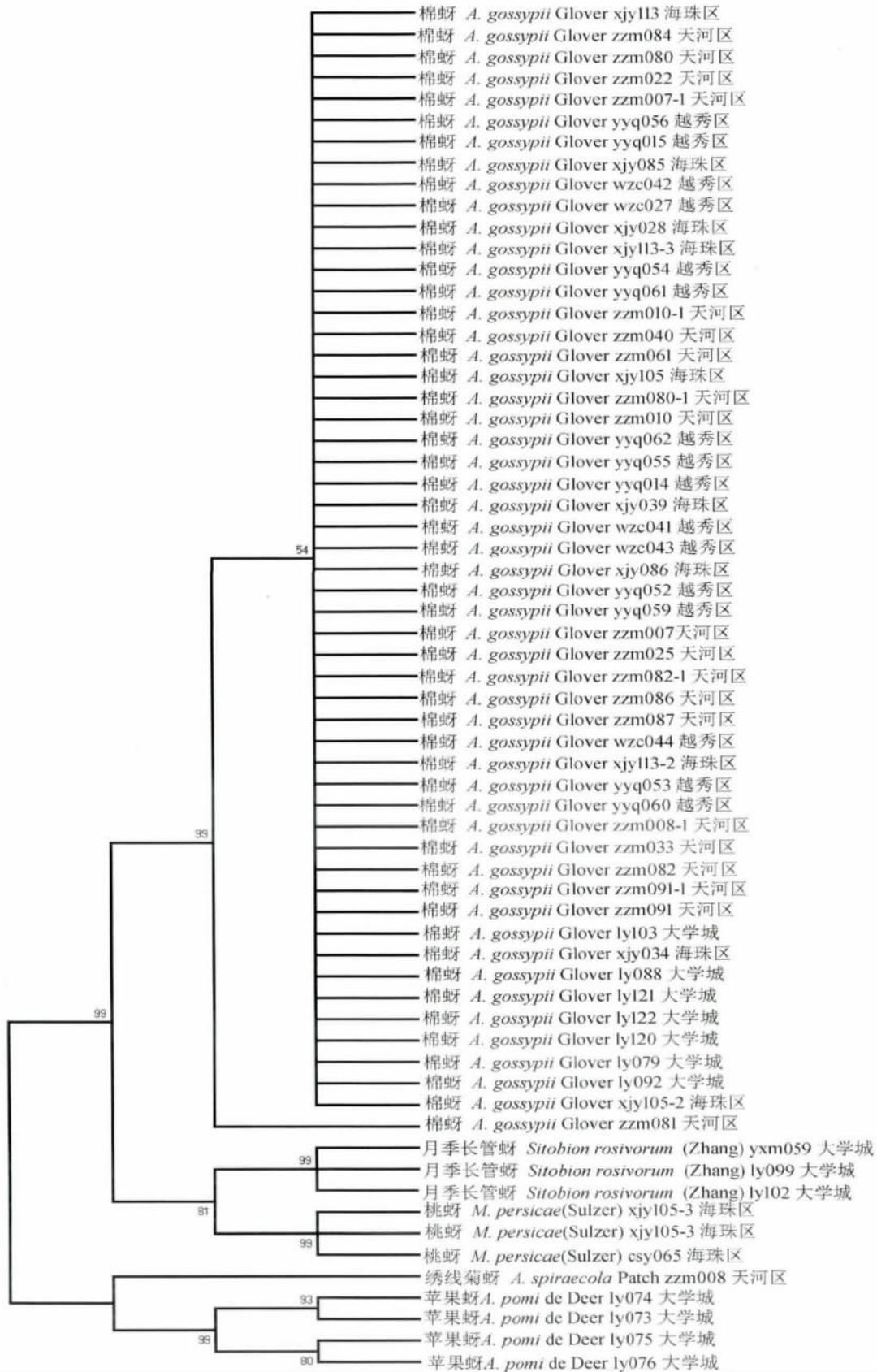


图2 基于 *COI* 序列和 K2P 模型构建的 NJ 树 (自举检验支持率标注于分支基部)  
 Fig.2 Neighbour - Joining (NJ) tree based on *COI* sequences and Kimura's two parameter  
 (bootstrap percentages shown on the base of branches)

表 2 各种种内遗传距离

Table 2 Mean and range of intraspecific genetic distance

物种 Species	样品数 No. of individuals	平均距离 (%) Meandistance	范围 (%) Range
棉蚜 <i>Aphis gossypii</i> Glover	54	0.22 ± 0.86	0 - 1.70
月季长管蚜 <i>Sitobion rosivorum</i> (Zhang)	3	0.20	-
桃蚜 <i>Myzus persicae</i> (Sulzer)	3	0	-
苹果蚜 <i>A. pomi</i> de Geer	4	1.90 ± 0.16	1.40 - 2.30

表 3 各种种间遗传距离

Table 3 Mean and range of interspecific genetic distance

	棉蚜 <i>A. gossypii</i> Glover	月季长管蚜 <i>Sitobion rosivorum</i> (Zhang)	桃蚜 <i>M. persicae</i> (Sulzer)	苹果蚜 <i>A. spiraeicola</i> Patch
棉蚜 <i>A. gossypii</i> Glover	-	-	-	-
月季长管蚜 <i>Sitobion rosivorum</i> (Zhang)	9.60 ± 0.79	-	-	-
桃蚜 <i>M. persicae</i> (Sulzer)	9.65 ± 0.58	9.43 ± 0.09	-	-
苹果蚜 <i>A. pomi</i> de Geer	8.76 ± 0.96	10.15 ± 0.70	9.93 ± 0.61	-
绣线菊蚜 <i>A. spiraeicola</i> Patch	8.80 ± 0.68	8.31 ± 0.00	7.60 ± 0.00	3.68 ± 0.40

### 3 结论与讨论

#### 3.1 基于 *COI* 基因的条形码对木槿蚜虫的鉴定效力

*COI* 基因作为条形码技术的分子标记, 能否鉴定出物种取决于种间遗传距离和种内遗传距离的差异程度 (Aliabadian *et al.*, 2009), 在种间遗传距离与种内遗传距离存在“Barcoding Gap”时, 鉴定成功率较高。Hebert 等 (2003) 对脊椎动物和无脊椎动物的线粒体 *COI* 基因序列分析得出结论: 除腔肠动物外, 98% 物种的种内遗传距离差异为 0 - 2.00%, 种间遗传距离差异平均可达 11.30%。本研究收集了广州市越秀区、天河区、海珠区和大学城木槿植物上 64 个蚜虫样品, 种内平均差异为 0.30%, 种间平均差异为 9.00%, 种间平均差异是种内平均差异的 30 倍, 物种间没有重叠 (图 3)。所有的样品鉴定效率达 99%, 说明所扩增的 *COI* 基因作为鉴定木槿蚜虫的条形码是可行的。这一结论也与已有蚜虫条形码研究相一致 (Pelletier *et al.*, 2012; 陈睿等, 2013; Rebijith *et al.*, 2013; 王哲, 2013; 汪珍春等, 2013; 温娟等, 2013; Armelle *et al.*, 2014; )。

#### 3.2 基于 *COI* 基因的条形码有助于了解物种的多样性

从 NJ 树上可以看出, 木槿蚜虫在地理分布上

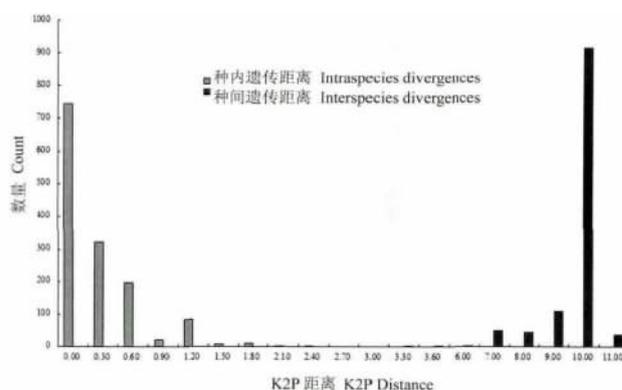


图 3 基于线粒体 *COI* 649 bp 序列和 K2P 距离的种间序列差异频次图

Fig. 3 Histogram of genetic divergence using mitochondrial *COI* 649 bp sequences. Divergences were calculated using Kimura's two parameter model (K2P)

存在一定的规律, 所有区的木槿植物上都有棉蚜寄生, 且聚为一支, 没有出现种下分化, 是为害木槿植物的主要种类。而桃蚜、苹果蚜、月季长管蚜主要分布在珠江以南的海珠区和大学城, 尤以大学城的种类丰富, 同时分布有 4 种。这主要与大学城的地理位置有关。广州大学城位于广州市番禺区小谷围岛, 东经 113°40', 北纬 23°06', 面积 17.9 km<sup>2</sup>, 拥有南亚热带季风气候, 温暖多雨、光热充足、夏季长、霜期短等特征。大学城

拥有绿化面积上千亩, 植被 500 余种, 拥有完整而良好的生态环境, 所以蚜虫的种类较丰富。而其他 3 个区为中心城区, 植被多为人工栽培品种, 较为单一, 所以蚜虫种类也较单一, 主要以棉蚜为主, 且种群数量较大。木槿是棉蚜的主要冬寄主, 夏寄主以黄瓜等蔬菜为主 (Liu *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2001), 当木槿秋季被棉蚜大范围受害后易造成夏季蔬菜的蚜虫虫害。因此, 对 *COI* 基因序列的分析和研究可以为物种多样性研究提供信息。

### 3.3 基于 *COI* 基因的条形码有助于蚜虫的鉴定

蚜虫具有非常复杂的多型现象, 同时不同的生物型也存在不同的季节型或者颜色型。棉蚜在木槿的叶、茎、花上都有寄生, 体色有白色、白绿色、黄色、粉绿色、墨绿色和黑色 (图 1), 仅根据形态学的鉴定很容易混淆, 基于 *COI* 基因的 DNA 条形码能有效地将同一寄主同一器官或不同器官上颜色不同的蚜虫进行准确地鉴定。

因此, 基于 *COI* 基因的 DNA 条形码可以帮助解决常见危害木槿上不同种蚜虫易被混淆的问题, 同时还可以避免将特征差异较大 (例如: 体型不等、体色不同) 的同种蚜虫鉴定为不同物种的错误, 对非专业分类人员的快速准确鉴定蚜虫物种起到了极大的帮助, 可为提高木槿蚜虫的防治效率, 降低防治成本做出贡献。

致谢: 感谢中国科学院动物研究所蚜虫系统进化研究组的乔格侠研究员对本样品的鉴定, 以及温娟硕士在软件使用方面的悉心指导。

### 参考文献 (References)

- Aliabadian M, Kaboli M, Nijni V, *et al.* Molecular identification of birds performance of distance - base DNA barcoding in three genes to delimit it parapatric species [J]. *PLoS ONE*, 2009, 4 (1): e4119.
- Armelle CD, Astrid C, Emmanuelle A, *et al.* DNA Barcoding and the associated PhylAphidB@se website for the identification of European aphids (Insecta: Hemiptera: Aphididae) [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (6): e97620.
- Chen R, Jiang LY, Qiao GX. DNA barcoding in rapid identification of aphids on *Pinus armandii* [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2013, 50 (1): 50 - 60. [陈睿, 姜立云, 乔格侠. 华山松不同生态位上蚜虫的快速鉴定——基于 DNA 条形码 [J]. *应用昆虫学报*, 2013, 50 (1): 50 - 60]
- Ellis PR, Pink DAC, Phelps K, *et al.* Evaluation of a core collection of *Brassica oleracea* accessions for resistance to *Brevicoryne brassicae*, the cabbage aphid [J]. *Euphytica*, 1998, 103 (2): 149 - 160.
- Favret C. Aphid Species File. Version 5.0/5.0 [Z]. Verified 7 August 2013. <http://Aphid.SpeciesFile.org>.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 2003, 270: 313 - 321.
- Liu XD, Zhang XX. Studies on the fitness to different host plants and season type of cotton aphids. In: Proceedings of 2000 Annual Congress of Chinese Entomology Society (in Chinese) [C]. Beijing, 2000, 747 - 750.
- Liu Z, Huang XL, Jiang LY, *et al.* The species diversity and geographical distribution of aphids in China (Hemiptera: Aphidoidea) [J]. *Acta Zootax. Sin.*, 2009, 34 (2): 277 - 291.
- Pelletier Y, Nie X, Giguère MA, *et al.* A new approach for the identification of aphid vectors (Hemiptera: Aphididae) of potato virus [J]. *Journal of Economic Entomology*, 2012, 105 (6): 1909 - 14.
- Rebijith KB, Asokan R, Kumar NK, *et al.* DNA barcoding and elucidation of cryptic aphid species (Hemiptera: Aphididae) in India [J]. *Bulletin of Entomological Research*, 2013, 103 (5): 601 - 10.
- Tamura K, Nei M. Estimation of the number nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees [J]. *Mol. Biol. Evol.*, 1993, 10: 512 - 526.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0 [J]. *Mol. Biol. Evol.*, 2007, 24: 1596 - 1599.
- Wang JF, Jiang LY, Qiao GX. DNA barcoding of genus *Toxoptera* Koch (Hemiptera: Aphididae): Identification and molecular phylogeny inferred from mitochondrial *COI* sequences [J]. *Insect Sci.*, 2009, 16 (6): 475 - 484.
- Wang Z, Jing RY, Qiao GX. Rapid identification of aphids on *Amygdalus* plants using DNA barcoding [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2013, 50 (1): 41 - 49. [王哲, 景若芸, 乔格侠. 基于 DNA 条形码对桃属植物上蚜虫的快速鉴定 [J]. *应用昆虫学报*, 2013, 50 (1): 41 - 49]
- Wen J, Chen R, Jiang LY, *et al.* Rapid identification of aphids on flowering plants of Rosaceae in Beijing based on DNA barcoding [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2013, 50 (1): 29 - 40. [温娟, 陈睿, 姜立云, 等. 基于 DNA 条形码对北京地区蔷薇科花卉上蚜虫的快速鉴定 [J]. *应用昆虫学报*, 2013, 50 (1): 29 - 40]
- Wang ZC, Wang XL, Zheng YS, *et al.* Rapid identification of aphids on Chrysanthemum plants in Guangzhou based on DNA barcoding [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2013, 35 (6): 764 - 771. [汪珍春, 王小兰, 郑毅胜, 等. DNA 条形码快速鉴定广州常见菊花蚜虫 [J]. *环境昆虫学报*, 2013, 35 (6): 764 - 771]
- Xia X, Xie Z. DAMBE: data analysis in molecular biology and evolution [J]. *J. Hered.*, 2001, 92: 371 - 373.
- Zhang XX, Zhao JY, Zhang GX. Studies on population adaptation and differentiation of *Aphis gossypii* Glover, among host plant transplantation [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2001, 21 (1): 106 - 111.
- Zhang GX, Zhong TS. Economic Insect Fauna of China Fasc. 25. Homoptera: Aphidinea (I) [M]. Beijing: Science Press. 1983, 1 - 3387. [张广学, 钟铁森. 中国经济昆虫志, 第 25 册, 同翅目, 蚜虫类 (一) [M]. 北京: 科学出版社. 1983, 1 - 3387]