

# 基于线粒体 CO I 基因序列的中国二点委夜蛾遗传多态性分析

朱彦彬<sup>1,4,#</sup>, 马继芳<sup>1,#</sup>, 董立<sup>1</sup>, 李立涛<sup>1</sup>, 姜京宇<sup>2</sup>,  
李智慧<sup>3</sup>, 董志平<sup>1</sup>, 董金皋<sup>4,\*</sup>, 王勤英<sup>5,\*</sup>

(1. 河北省农林科学院谷子研究所, 石家庄 050035; 2. 河北省植保植检站, 石家庄 050031;  
3. 正定县植保植检站, 河北正定 050800; 4. 河北农业大学生命科学学院, 河北保定 071000;  
5. 河北农业大学植物保护学院, 河北保定 071000)

**摘要:** 二点委夜蛾 *Athetis lepigone* 是 2005 年首次在河北省发现危害夏玉米苗的新害虫, 2011 年 7 月在河北、河南、山东、山西、安徽和江苏 6 省 47 市夏玉米苗期大面积暴发成灾, 严重威胁玉米生产。为了从种群水平探讨该虫暴发成灾的机制, 我们通过分析线粒体细胞色素氧化酶亚基 I (mtCO I) 基因序列来研究不同地区二点委夜蛾种群的进化关系。本研究采集了河北、河南、山东和山西等地的 19 个不同地理种群样本, 用同源序列比对的方法分析样本 mtCO I 基因片段, 利用 DnaSP 5.0 软件和 Arlequin 3.5 软件对不同地理种群间的 mtCO I 单倍型多样性分析和 Tajima's *D* 中性检测, 建立了单倍型邻接(N-J)系统发育进化树和单倍型网络图。结果表明, 在 203 头个体的 658 bp mtCO I 基因片段中, 得到 17 种单倍型和 18 个变异位点, 河北省的二点委夜蛾的单倍型多态性最丰富, 而河南、山东和山西 3 省采集的二点委夜蛾样品其单倍型均有与河北种群单倍型一致的类型。二点委夜蛾不同地理种群间基因流水平较高, 种群间没有明显的遗传分化, 并且在较近的历史时期未经历明显的种群扩张。

**关键词:** 二点委夜蛾; 线粒体 CO I; 单倍型; 遗传多态性; 地理种群

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2012)04-0457-09

## Analysis of genetic polymorphism of *Athetis lepigone* (Lepidoptera: Noctuidae) populations from China based on mtDNA CO I gene sequences

ZHU Yan-Bin<sup>1,4,#</sup>, MA Ji-Fang<sup>1,#</sup>, DONG Li<sup>1</sup>, LI Li-Tao<sup>1</sup>, JIANG Jing-Yu<sup>2</sup>, LI Zhi-Hui<sup>3</sup>, DONG Zhi-Ping<sup>1</sup>, DONG Jin-Gao<sup>4,\*</sup>, WANG Qin-Ying<sup>5,\*</sup> (1. Millet Institute, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050031, China; 2. Plant Protection and Quarantine Station of Hebei Province, Shijiazhuang 050031, China; 3. Plant Protection and Quarantine Station of Zhengding County, Zhengding, Hebei 050800, China; 4. College of Life Sciences, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000, China; 5. College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000, China)

**Abstract:** *Athetis lepigone* is a newly recorded insect pest of summer corn seedlings, which was first found in Hebei province in 2005 and broke out on a large scale in Hebei, Henan, Shandong, Shanxi, Anhui and Jiangsu in July, 2011. In order to explore its outbreak mechanisms at the population level, we analyzed the genetic diversity of *A. lepigone* populations from four provinces of China using mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (mtCO I) gene. The partial sequences (658 bp) of mtCO I gene in 19 geographic populations of *A. lepigone* were sequenced and analyzed through homologous sequence alignment. We also carried out the mtCO I haplotype diversity analysis and Tajima's *D* test, and constructed the Neighbor-Joining (N-J) phylogenetic tree and haplotype network of CO I haplotypes of

基金项目: 河北省科技厅“主要粮食作物新发生重大病虫害发生规律及防控体系研究与应用”(11220301D)

作者简介: 朱彦彬, 男, 1986 年生, 河北磁县人, 硕士, 主要从事分子生物学研究, E-mail: zhuyanbin251@163.com;

马继芳, 女, 1964 年生, 河北石家庄人, 助理研究员, 主要从事农作物害虫研究, E-mail: zhibaoshi@yahoo.com.cn

# 共同第一作者 Authors with equal contribution

\* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: wqinying@yahoo.com.cn; dongjingao@126.com

收稿日期 Received: 2012-01-16; 接受日期 Accepted: 2012-03-29

different populations using DnaSP 5.0 and Arlequin 3.5, respectively. The results showed that there were 17 haplotypes and 18 variable sites in the total 203 individuals. The analysis of phylogenetic tree and haplotype network based on 17 mtCO I haplotypes indicated that the polymorphism of mtCO I haplotypes of *A. lepigone* populations from Hebei province was the highest among four provinces. The haplotypes of *A. lepigone* populations from Henan, Shanxi and Shandong were the same as those from Hebei population. However, the results of Tajima's *D* test suggested that total populations did not experience obvious expansion in recent history. These results suggest that the level of gene flow among all populations of *A. lepigone* is high, and there is not obvious genetic differentiation among populations.

**Key words:** *Athetis lepigone*; mtDNA CO I; haplotype; genetic polymorphism; geographic population

二点委夜蛾 *Athetis lepigone* 属鳞翅目, 夜蛾科, 委夜蛾属, 分布于欧洲、中国、日本、朝鲜等地(陈一心, 1999; Nikolaevitch and Vjatcheslavovna, 2003), 是 2005 年在河北省首次发现可严重危害夏玉米生产的一种新害虫; 其成虫、幼虫均喜欢在有麦秸覆盖的玉米地栖息危害, 近几年推行的小麦收获后秸秆还田为二点委夜蛾生存、繁殖及虫量累积、扩散创造了良好的适生环境, 发生面积逐年扩大, 危害日益严重(姜京宇等, 2008)。至 2010 年在河北邯郸、邢台、沧州、衡水、石家庄、保定等中南部地区普遍发生(李立涛等, 2011)。2011 年在河南、山东、山西等全国 6 省 47 市 302 个区(县)暴发危害, 面积近 220 万  $\text{hm}^2$ , 占夏玉米播种面积的 20%, 是近年玉米生产中少见的严重虫害(王振营等, 2012)。为了澄清二点委夜蛾暴发原因, 采用现代分子生物学技术, 分析不同省份及地区暴发的二点委夜蛾群体之间的内在关系, 从遗传学方面研究探讨二点委夜蛾的扩散危害规律, 对二点委夜蛾的防控具有非常重要的意义。

分子标记技术为生物种群的遗传变异研究提供了重要技术保障, 由于生物体的线粒体基因组(mtDNA)严格遵守母系遗传, 几乎不发生遗传重组, 能够全面反映种群内和种群间的遗传变异, 且其结构简单, 进化速率快, 因而被广泛应用于探索种群结构和遗传多样性的研究(Norgate *et al.*, 2009)。其中线粒体细胞色素氧化酶亚基 I (CO I) 基因和 16S rRNA 基因在脊椎动物和无脊椎动物种类鉴别、群体遗传多样性和分子系统进化学等研究方面均得到广泛应用(Novo *et al.*, 2010; Feng *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2011)。CO I 基因能够用于研究昆虫各类群系统发育关系和进化以及验证传统分类系统, 建立物种的自然系统和进化关系, 有助于物种的区别鉴定、发现隐存种、研究物种分化和遗传多样性(Collet *et al.*, 2006; 杨宝山等, 2009; 池宇等, 2010; 梁日霞等, 2011)。本研究从不同地区采

集了二点委夜蛾样本, 选用线粒体 CO I 基因作为分子标记, 对部分重灾区的二点委夜蛾种群的遗传多样性、遗传结构, 以及种群间的遗传分化和基因交流程度进行了分析, 有助于揭示该害虫的扩散途径和发生规律, 为进一步制定该害虫的治理策略提供科学的依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

实验所用的二点委夜蛾成虫是 2011 年采自河北、河南、山东、山西四省 19 个市县的灯诱成虫个体材料(表 1)。采集的样品放于 95% 乙醇中,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.2 基因组 DNA 的提取

用动物组织/细胞基因组快速提取试剂盒(上海生工生物工程有限公司, 简称上海生工)提取基因组 DNA, 保存于  $-20^{\circ}\text{C}$  备用。

### 1.3 CO I 基因 PCR 扩增和测序

CO I 基因序列的 PCR 扩增引物为 LCO1490: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' 和 HCO2198: 5'-TAAACTTGAGGGTGACCAAAAAATCA-3' (Folmer *et al.*, 1994)。引物由上海生工合成。PCR 扩增总反应体系为 20  $\mu\text{L}$ , 其中模板 DNA 2.0  $\mu\text{L}$  (约 50 ng)、上下游引物各 1  $\mu\text{L}$  (浓度 10  $\mu\text{mol/L}$ )、10  $\times$  PCR buffer 2.0  $\mu\text{L}$ 、dNTP 1.6  $\mu\text{L}$  (2.5 mmol/L)、酶 0.3 U、超纯水补足。反应程序:  $94^{\circ}\text{C}$  5min; 35 个循环( $94^{\circ}\text{C}$  45 s,  $54^{\circ}\text{C}$  45 s,  $72^{\circ}\text{C}$  1 min);  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 并回收目的条带。按照试剂盒 (TaKaRa) 上的步骤把切胶回收的目的片段与 pMD19-T 载体连接, 把阳性克隆的菌液送上海生工测序。

### 1.4 序列分析

先利用 Sequencher\_v4.1.4 软件读取测序的序列, 观察峰值进行反复校对, 利用 DNAMAN\_v6、ClustalX1.81 (Thompson *et al.*, 1997) 软件对测得的

表 1 二点委夜蛾种群样本的采集信息

Table 1 Collecting data of *Aethis lepigone* in this study

种群代码 Population code	采集地区 Collecting locality	供试样本量 Number of individuals tested	地理位置 Geo-coordinates	采集时间 Collecting date
CX	河北沧县 Cangxian, Hebei	10	38.30°N, 116.87°E	2011/08/21
FN	河北丰宁 Fengning, Hebei	11	41.20°N, 116.63°E	2011/08/19
GC	河北故城 Gucheng, Hebei	10	37.36°N, 115.96°E	2011/08/19
AX	河北安新 Anxing, Hebei	12	38.92°N, 115.92°E	2011/08/20
YX	河北易县 Yixian, Hebei	11	39.35°N, 115.49°E	2011/08/29
FP	河北阜平 Fuping, Hebei	11	38.50°N, 114.11°E	2011/09/02
LC	河北栾城 Luancheng, Hebei	11	37.88°N, 114.65°E	2011/08/02
ZD	河北正定 Zhengding, Hebei	11	38.13°N, 114.56°E	2011/08/03
XJ	河北辛集 Xinji, Hebei	10	37.54°N, 115.12°E	2011/08/03
LY	河北隆尧 Longyao, Hebei	11	37.35°N, 114.75°E	2011/08/06
LX	河北临西 Linxi, Hebei	10	36.87°N, 115.50°E	2011/08/06
QX	河北邱县 Qiuxian, Hebei	10	36.84°N, 115.18°E	2011/08/06
GT	河北馆陶 Guantao, Hebei	11	36.37°N, 115.40°E	2011/08/06
YY	河南原阳 Yuanyang, Henan	10	35.05°N, 113.96°E	2011/08/12
SQ	河南商丘 Shangqiu, Henan	10	34.27°N, 115.39°E	2011/08/12
QD	山东青岛 Qingdao, Shandong	11	36.77°N, 119.97°E	2011/08/15
JN	山东济南 Jinan, Shandong	12	36.65°N, 117.00°E	2011/08/15
HT	山西洪桐 Hongtong, Shanxi	10	36.25°N, 111.28°E	2011/08/13
JC	山西晋城 Jincheng, Shanxi	11	39.91°N, 116.38°E	2011/08/13

序列与从 GenBank 上下载的序列进行多序列同源比对, 分析单倍型数和变异位点。运用软件 DnaSP 5.0 (Librado and Rozas, 2009) 分析其单倍型多样性 (haplotype diversity,  $Hd$ ) 和核苷酸多样性指数 (nucleotide diversity,  $Pi$ )。根据 MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011) 中提供的模型选择适合的建树模型, 以夜蛾科的小地老虎 *Agrotis ipsilon* CO I 基因作为外群, 用邻接法构建单倍型系统树, 并利用  $p$ -距离计算各单倍型之间的遗传距离。用 Arlequin 3.5.1.2 软件 (Excoffier *et al.*, 2005) 对种群进行分子变异分析 (AMOVA)。单倍型网络图由软件 NETWORK4.6 (Bandelt *et al.*, 1999) 进行绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 二点委夜蛾 CO I 基因片段的序列分析

分别以 19 个种群的 203 个个体的 DNA 为模板进行线粒体 CO I 基因片段的 PCR 扩增, 共得到二点委夜蛾 CO I 序列 203 个, 长度为 658 bp, 把其中一条序列进行网上 Blast, 与干委夜蛾 *Aethis pallustris* 相应序列的一致性为 93%, 可认为二点委

夜蛾和其为一属, 这与形态学分类吻合。

CO I 基因种内多态性位点有 18 个, 其中多变异位点 7 个, 这些突变多数发生在密码子第一位上, 以 A-G/T-C 颠换为主, 这些变异大多属于同义突变, 这样的变异可能使得基因更稳定。由表 2 可知, 二点委夜蛾种内变异为 2.73%, 并且 mtCOI 基因中 A + T 含量很高, 在 70.6% ~ 71.4% 之间, 平均 71.1%, 有明显的 A + T 偏向性。这是昆虫线粒体基因序列碱基组成的一种共性 (任竹梅等, 2002; Nei and Kumar, 2002), 且二点委夜蛾表现出明显的 T 偏倚。

本实验所扩增的二点委夜蛾不同种群 CO I 基因片段所编码的氨基酸序列基本相同, 这些序列都不含缬氨酸 (V)、谷氨酰胺 (Q) 和谷氨酸 (E), 其中苯丙氨酸 (F) 含量最高 (31.8%), 其次为酪氨酸 (Y)、异亮氨酸 (I)、天冬酰胺 (N) 和丝氨酸 (S) 等。在 63 个密码子中有 19 个密码子没有使用, 密码子使用频率最高的为 UUU (苯丙氨酸), 同科不同属的小地老虎 mtCOI 片段 (GenBank 登录号为 GU438723.1) 密码子使用频率最高的也为 UUU。

表 2 二点委夜蛾样本和小地老虎 CO I 单倍型的变异位点  
 Table 2 Variation sites in CO I haplotypes of *Aethis lepigone* and *Agrotis ipsilon*

	1 1 1 1 1 1 2 2 2 2 2 2 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3																																	
	4	4	5	7	7	8	8	0	2	2	3	3	6	0	2	3	3	7	8	8	0	1	2	3	3	4	4	4	5	6	7			
	3	9	0	0	4	2	5	6	1	7	3	9	0	2	0	5	8	7	7	9	6	3	2	4	7	3	6	9	2	1	3			
ZB1	A	C	C	A	T	T	T	C	T	T	T	A	G	A	C	T	T	T	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	T			
ZB2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.		
ZB3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
ZB4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	T	.		
ZB5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
ZB6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.		
ZB7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	
ZB8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
ZB9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	
ZB10	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
ZB11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
ZB12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
ZB13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	
ZB14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
ZB15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	T	.	.		
ZB16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	
ZB17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
WQ	a	t	T	t	c	c	a	t	a	t	a	t	a	a	t	t	t	a	t	a	t	c	a	a	a	c	a	a	c	a	t	a	t	a
	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	6	6	6	6	6	6	
	7	8	8	8	8	9	0	0	0	1	2	2	7	7	7	7	8	8	2	2	3	3	4	5	8	8	0	1	2	2	3	3		
	9	2	5	6	8	1	0	1	3	5	1	8	4	7	8	9	4	7	3	9	3	6	7	3	6	9	4	0	7	8	4	7		
ZB1	T	T	T	T	A	A	A	T	A	T	T	T	A	G	A	C	A	T	T	A	T	C	A	T	G	T	T	T	G	G	C	A		
ZB2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	
ZB3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
ZB4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	
ZB5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	
ZB6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
ZB7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	A	.	.	.	
ZB8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
ZB9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	
ZB10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
ZB11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	
ZB12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
ZB13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	
ZB14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
ZB15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
ZB16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	
ZB17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.
WQ	a	a	c	c	t	t	t	c	t	a	c	c	a	a	t	t	t	c	t	a	c	t	t	a	a	c	a	c	g	t	t	t		

ZB1 - ZB17: 二点委夜蛾单倍型 (GenBank 登录号 JQ395055 ~ JQ395071) Haplotypes of *A. lepigone* (GenBank accession numbers; JQ395055 - JQ395071); WQ: 小地老虎单倍型 (GenBank 登录号 GU438723.1) Haplotypes of *A. ipsilon* (GenBank accession number; GU438723.1). 下同 The same for the following tables and figures.

表 3 二点委夜蛾各地理种群 CO I 单倍型多样性、核苷酸多样性分析及 Tajima's *D* 中性检验Table 3 CO I haplotype diversity, nucleotide diversity and Tajima's *D* test in different geographic populations of *Athetis lepigone*

种群 代码 Population code	单倍型分布 Distribution of haplotypes ( <i>h</i> )	单倍型总数 Number of haplotypes	单倍型多样性 Haplotype diversity ( <i>Hd</i> )	核苷酸多样性 Nucleotide diversity ( <i>Pi</i> )	核苷酸平均差异 Average number of nucleotide differences ( <i>K</i> )	中性检测 Tajima's <i>D</i>	中性检测显著性 Statistical significance
	ZB1(2) ZB2(3) ZB10(1)						
CX	ZB11(1) ZB15(1) ZB16(1) ZB17(1)	7	0.911	0.00365	2.40000	-0.12736	$P > 0.10$
FN	ZB1(10) ZB15(1)	2	0.182	0.00028	0.18182	-1.12850	$P > 0.10$
GC	ZB1(10)	1	0	0	-	-	-
AX	ZB1(9) ZB7(1) ZB15(1) ZB16(1)	4	0.455	0.00184	1.21212	-0.98759	$P > 0.10$
YX	ZB2(5) ZB9(1) ZB11(2) ZB15(3)	4	0.709	0.00315	2.07273	1.89576	$0.10 > P > 0.05$
FP	ZB1(6) ZB2(4) ZB14(1)	3	0.618	0.00188	1.23636	0.70880	$P > 0.10$
LC	ZB1(4) ZB2(4) ZB5(1) ZB11(2)	4	0.764	0.00293	1.92727	1.50577	$P > 0.10$
ZD	ZB1(8) ZB8(1) ZB11(1) ZB15(1)	4	0.491	0.00139	0.90909	-1.79107	$P < 0.05^*$
XJ	ZB1(2) ZB2(3) ZB3(1) ZB11(1) ZB15(3)	5	0.848	0.00343	2.25758	1.34004	$P > 0.10$
LY	ZB1(6) ZB2(3) ZB11(1) ZB15(1)	4	0.673	0.00155	1.01818	1.50194	$P > 0.10$
LX	ZB1(5) ZB2(3) ZB4(1) ZB11(1)	4	0.711	0.00196	1.28889	0.77501	$P > 0.10$
QX	ZB1(4) ZB2(1) ZB10(1) ZB17(4)	4	0.733	0.00311	2.04444	0.62848	$P > 0.10$
GT	ZB1(3) ZB2(5) ZB6(1) ZB11(2)	4	0.764	0.00293	1.92727	0.49420	$P > 0.10$
YY	ZB1(8) ZB6(1) ZB7(1)	3	0.378	0.00084	0.55556	-0.69098	$P > 0.10$
SQ	ZB1(6) ZB2(3) ZB11(1)	3	0.389	0.00118	0.77778	0.19590	$P > 0.10$
QD	ZB1(9) ZB2(1) ZB11(1)	3	0.439	0.00180	1.8182	-0.37901	$P > 0.10$
JN	ZB1(4) ZB2(4) ZB11(1) ZB15(3)	4	0.773	0.00371	2.43939	1.74485	$0.10 > P > 0.05$
HT	ZB1(5) ZB2(4) ZB5(1)	3	0.644	0.00193	1.26667	0.69962	$P > 0.10$
JC	ZB1(9) ZB2(2)	2	0.327	0.00099	0.65455	-0.12670	$P > 0.10$
总种群 Total population		17	0.650	0.00201	1.32283	-1.49004	$P > 0.10$

## 2.2 二点委夜蛾 CO I 单倍型多样性分析和 Tajima's *D* 中性检测

从二点委夜蛾所有种群的 203 头样本个体中共检测出 17 种单倍型, 分别命名为 ZB1 ~ ZB17, 将所有单倍型的 CO I 基因序列提交 GenBank, 登录号为 JQ395055 ~ JQ395071。以小地老虎作为外群 (GenBank 登录号为 GU438723.1), 对二点委夜蛾的所有种群进行多样性分析和 Tajima's *D* 分析, 结果见表 3。从表 3 和图 1 可以看出, 大部分区域都存在 ZB1 和 ZB2。在 17 种单倍型中出现频率最高的是 ZB1, 占全部个体的 54.2% (110/203), 除易县种群 (YX) 外其他 18 个种群都具有该单倍型, 且故城种群 (GC) 的全部个体均属于该单倍型; 其次出现频率较高的单倍型为 ZB2, 约占 22.2% (45/203), 有 4 个地区没有检测到该类型; ZB11 单倍型有 15 头个体, ZB15 单倍型有 10 头个体; 其他单倍型出现频率较低, 有 10 个单倍型仅出现一次, 属于稀有单倍型。河北沧县和辛集两地遗传多样性丰富。

单倍型多样性 (*Hd*) 和核苷酸多样性 (*Pi*) 是评价一个群体 mtDNA 变异程度的主要指标, *Hd* 和 *Pi* 值越大, 表明群体的遗传多样性越丰富 (Smith *et al.*, 2006)。由表 3 可以看出, *Hd* 为 0.650, *Pi* 为 0.00201, 核苷酸平均差异数 (average number of nucleotide differences, *K*) 为 1.32283, 差异范围 0.18182 ~ 2.43939 之间。不同地理种群的单倍型多样性在 0 ~ 0.911 之间, 核苷酸多样性在 0 ~ 0.00371 之间。

对各种群间的单倍型进行 Tajima's *D* 中性检测分析结果表明 (表 3), 河北正定的群体表现显著, 而其他地区的群体表现均不显著, 说明在所检测的 19 个地区中, 仅有正定的二点委夜蛾在较近的历史时期种群发生了增长。但是, 对所有种群单倍型进行 Tajima's *D* 分析, Tajima's *D* = -1.49004, 结果不显著 ( $P > 0.10$ ) (Tajima, 1989), 表明二点委夜蛾总体上在较近的历史时期未经历明显的种群扩张。

## 2.3 二点委夜蛾各 CO I 单倍型之间的系统进化和遗传分析

根据 MEGA5.05 中提供的 models 选择邻接法 (NJ) 构建系统进化树 (图 1)。从进化树可以看出, 二点委夜蛾 CO I 基因 17 种单倍型与外群 CO I 基因分开, 在种群中出现次数较多的 ZB1 和 ZB2 分别位于两支上; 单倍型网络图更清晰地说明各单倍型

之间的关系 (图 2), ZB1 和 ZB2 与其他单倍型都有着紧密的联系, 因此推测 ZB1 和 ZB2 为二点委夜蛾的主要单倍型类型。

二点委夜蛾总种群的基因流 (*Nm*) 为 1.93, 固定系数 (*Fst*) (Hudson *et al.*, 1992) 为 0.11517, 遗传分化系数 (*Gst*) 为 0.11524。 *Nm* > 1, 表明群体间的基因流的水平较高, 群体间有某种渠道可以发生基因交流, 因此总种群之间还未产生明显的遗传分化 (Wright, 1951)。各种群间的 *Fst* 在 -0.08533 ~ 0.53886 之间; *Gst* 在 -0.04443 ~ 0.44491 之间。二点委夜蛾总种群的 *Gst* 与 *Fst* 接近, 且都小于 0.15, 表明总种群间不存在遗传结构上的高度分化 (Wright, 1951), 但是河北易县分别与河北丰宁、河北故城、河北安新、河南原阳、山东青岛、山西晋城的种群之间, 以及河北故城与河北沧县、河北辛集、河北馆陶的种群间的 *Gst* 均大于 0.25, 说明个别种群之间还是存在明显差异。AMOVA 分析结果 (表 4) 显示种群内的遗传变异 (88.48%) 远远大于种群间的遗传变异 (11.52%)。二点委夜蛾 CO I 基因的单倍型之间 ZB16 和 ZB6 的距离最远为 0.038, 明显低于二点委夜蛾与外群小地老虎之间 CO I 单倍型之间最近距离 0.114 (ZB6 与 WQ 之间) (表 5)。

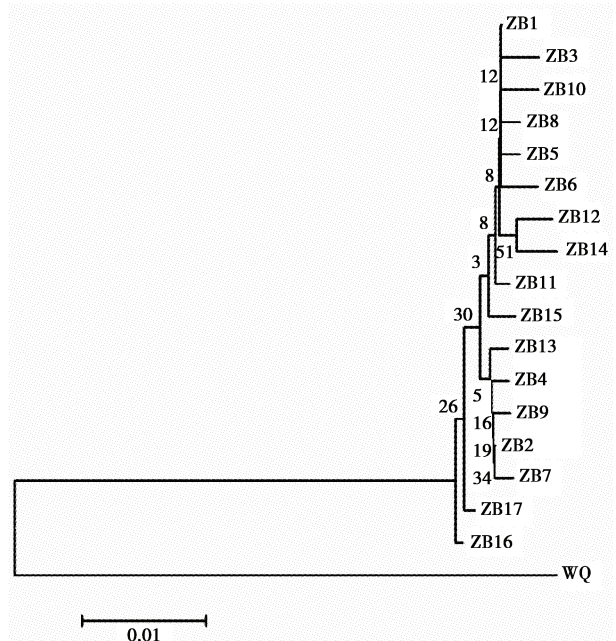


图 1 二点委夜蛾不同种群 CO I 单倍型的 NJ 进化树  
Fig. 1 Neighbor-Joining phylogenetic tree of CO I haplotypes of different populations of *Athlis lepigone*  
以 WQ 为外群 WQ is used as the outgroup; 以 0.01 的遗传距离作为标尺 Genetic distance of 0.01 as a ruler; 引导指令重复数为 1 000 次 Number of bootstrap replications = 1 000.

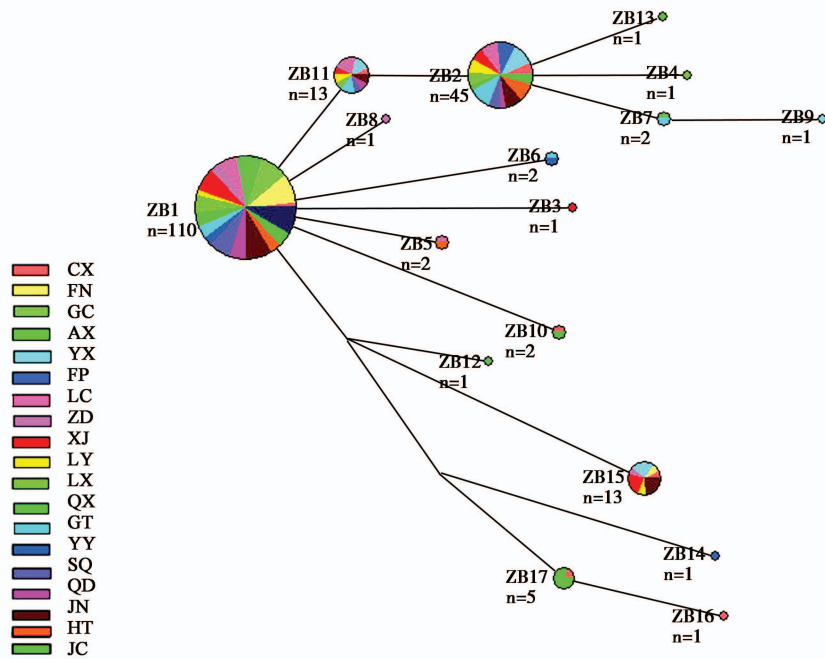


图2 二点委夜蛾不同种群 CO I 基因单倍型网络图

Fig. 2 Haplotype network of CO I gene of different populations of *Athetis lepigone*

圆面积表示具有相同单倍型的个体数量, 扇形面积表示不同种群样本在同一单倍型中所占比例。The area of each colored pie diagram reflects the number of individuals of each haplotype and coloured segments represent the proportion of the same haplotype that occurs in each sampling region.

表4 二点委夜蛾 19 个种群线粒体 CO I 基因的分子变异分析

Table 4 Analysis of molecular variance (AMOVA) of mitochondrial CO I gene in *Athetis lepigone* populations

变异来源 Source of variation	自由度 <i>df</i>	平方和 Sum of sequences	方差组分 Variance components	变异百分率 Percentage of variation	<i>F<sub>st</sub></i>
种群间 Among populations	18	25.607	0.07747 Va	11.52	
种群内 Within populations	184	109.506	0.59514 Vb	88.48	
总变异 Total	202	135.113	0.67261	100	0.11517

### 3 讨论

形态学的鉴定只是根据某个虫态(一般为成虫)的特征来鉴别, 要求鉴定人员必须有多年的经验和很深的昆虫知识背景, 而且必须获得成虫。分子标记可以不受专业和虫态等条件的限制, 能够准确、快速地分辨出该物种。但是, 如果是第一次出现的新物种, 仍然要结合形态学的分类方法来进行鉴定。

本研究基于 mtDNA CO I 基因片段初步分析了河北、河南、山东、山西等地二点委夜蛾种群遗传多样性水平及不同地理种群间的遗传进化关系, 从

实验结果可以看出 CO I 基因适合用于二点委夜蛾种内和种间遗传多样性和系统进化分析的分子标记。同时, 我们也选用 16S rRNA 基因片段来分析四省二点委夜蛾种群遗传多样性水平及不同地理种群间的遗传进化关系, 但是结果表明 16S rRNA 不适合用于研究二点委夜蛾种群的遗传多态性(未发表)。尽管 16S rRNA 是主要用来区分昆虫属、种以及分化时间较早的种群(王备新和杨莲芳, 2002; 戴仁怀等, 2008; 张卫东等, 2010), 但是在软体动物或海洋动物中 16S rRNA 在种内遗传分析应用较广泛(高俊娜等, 2010; 马春艳等, 2010)。因此, 对于是否选择 16S rRNA 来分析物种遗传多样性, 应该通过实验来确定。

表 5 二点委夜蛾不同种群CO I 单倍型未校正  $p$  距离Table 5  $p$ -distance of 17 CO I haplotypes among different populations of *Athetis lepigone*

	ZB1	ZB2	ZB3	ZB4	ZB5	ZB6	ZB7	ZB8	ZB9	ZB10	ZB11	ZB12	ZB13	ZB14	ZB15	ZB16	ZB17	WQ
ZB1																		
ZB2	0.003																	
ZB3	0.006	0.015																
ZB4	0.002	0.002	0.014															
ZB5	0.002	0.002	0.014	0.000														
ZB6	0.006	0.015	0.012	0.008	0.008													
ZB7	0.008	0.002	0.026	0.003	0.003	0.020												
ZB8	0.002	0.008	0.008	0.003	0.003	0.002	0.012											
ZB9	0.002	0.002	0.014	0.000	0.000	0.008	0.003	0.020										
ZB10	0.002	0.008	0.005	0.005	0.005	0.005	0.014	0.002	0.005									
ZB11	0.002	0.002	0.014	0.000	0.000	0.008	0.003	0.003	0.000	0.005								
ZB12	0.002	0.008	0.008	0.003	0.003	0.002	0.012	0.000	0.003	0.002	0.003							
ZB13	0.008	0.002	0.020	0.006	0.006	0.026	0.003	0.015	0.006	0.014	0.006	0.015						
ZB14	0.002	0.008	0.002	0.006	0.006	0.008	0.015	0.003	0.006	0.002	0.006	0.003	0.012					
ZB15	0.000	0.003	0.006	0.002	0.002	0.006	0.008	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.008	0.002				
ZB16	0.014	0.008	0.020	0.015	0.015	0.038	0.012	0.024	0.015	0.020	0.015	0.024	0.003	0.015	0.014			
ZB17	0.006	0.003	0.012	0.008	0.008	0.024	0.008	0.014	0.008	0.011	0.008	0.014	0.002	0.008	0.006	0.002		
WQ	0.147	0.150	0.193	0.129	0.129	0.114	0.135	0.129	0.129	0.141	0.129	0.129	0.175	0.169	0.147	0.220	0.193	

从研究结果可以看出,河南、山东、山西等地的二点委夜蛾单倍型都能在河北地区的单倍型中找到,而且河北省的单倍型更具多样化,其中河北省正定县二点委夜蛾群体中性检测结果表现显著,这可能与二点委夜蛾在河北省发生早且危害严重有关(李立涛等,2011)。从20世纪末开始,河北省严格禁止秸秆焚烧,并率先推行秸秆还田和免耕播种技术的地区,为二点委夜蛾创造了良好的适生环境,再加上该虫繁衍能力强,群体积累快,为河北省二点委夜蛾丰富的群体多样性提供了条件。基于二点委夜蛾CO I单倍型之间的系统进化和遗传分析结果表明,二点委夜蛾不同地理种群间基因流水平较高,种群间没有明显的遗传分化,在较近的历史时期未经历明显的种群扩张,说明二点委夜蛾多省份大范围暴发成灾不是在短期内种群扩散所致,而是本地种群在合适的条件下大量增殖造成的。

本实验只研究了二点委夜蛾部分重灾地区的样品,特别是山西、河南、山东三省采样点较少,尽管各采样点之间的地理距离较远也可以在一定程度上反映二点委夜蛾种群间的遗传变异,但是要全面了解我国二点委夜蛾的遗传多样性以及地理分化格局,还需要进一步扩大采样范围和样本量,同时采用更多的分子标记进行相互验证,才能更加深入地分析二点委夜蛾的成灾机制。

### 参考文献 (References)

Bandelt HJ, Forster P, Röhl A, 1999. Median-joining networks for

inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16 (1): 37–48.

- Chen YX, 1999. Fauna Sinica, Vol. 16. Lepidoptera: Noctuidae. Science Press, Beijing. 753–754. [陈一心, 1999. 中国动物志 (第16卷). 鳞翅目: 夜蛾科. 北京: 科学出版社. 753–754]
- Chi Y, Wang SD, Zhang CT, 2010. Advance of Diptera based on mitochondrial CO I gene. *Entomotaxonomia*, 32 (S1): 71–78. [池宇, 王诗迪, 张春田, 2010. 基于线粒体CO I基因的双翅目昆虫研究进展. 昆虫分类学报, 32(S1): 71–78]
- Collet T, Ferreira KM, Arias MC, Soares AEE, Del Lama MA, 2006. Genetic structure of Africanized honeybee populations (*Apis mellifera* L.) from Brazil and Uruguay viewed through mitochondrial DNA CO I-COII patterns. *Heredity*, 97: 329–335.
- Dai RH, Chen XX, Li ZZ, 2008. Phylogeny of Deltocephalinae (Hemiptera: Cicadellidae) from China based on partial 16S rDNA and 28S rDNA sequences combined with morphological characters. *Acta Entomologica Sinica*, 51(10): 1055–1064. [戴仁怀, 陈学新, 李子忠, 2008. 基于16S rDNA和28S rDNA基因序列与形态特征联合分析的中国角顶叶蝉亚科系统发育研究(半翅目: 叶蝉科). 昆虫学报, 51(10): 1055–1064]
- Excoffier L, Laval G, Schneider S, 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47–50.
- Feng YW, Li Q, Kong LF, Zheng XD, 2011. DNA barcoding and phylogenetic analysis of Pectinidae (Mollusca: Bivalvia) based on mitochondrial CO I and 16S rRNA genes. *Molecular Biology Reports*, 38: 291–299.
- Folmer O, Black M, Hoeh F, Lutz R, Vrijenhoek R, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 294–299.



- Gao JN, Liu P, Li J, Pan LQ, Gao BQ, Chen P, 2010. Comparison of genetic characteristics of three *Portunus trituberculatus* populations based on the sequences of mitochondrial 16S rRNA and CO I gene. *Progress in Fishery Sciences*, 31(5): 59–68. [高俊娜, 刘萍, 李健, 潘鲁青, 高保全, 陈萍, 2010. 利用 16S rRNA 和 CO I 基因序列对三疣梭子蟹不同群体遗传特征的比较分析. 渔业科学进展, 31(5): 59–68]
- Hudson RR, Slatkin M, Maddison WP, 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics*, 132: 583–589.
- Jiang JY, Li XQ, Xu YH, Li ZH, Zhang ZY, Xu H, 2008. Preliminary studies on *Athetis (Proxenus) lepigone*. *Plant Protection*, 34(3): 123–126. [姜京宇, 李秀芹, 许佑辉, 李智慧, 张志英, 许昊, 2008. 二点委夜蛾研究初报. 植物保护, 34(3): 123–126]
- Li LT, Ma JF, Dong L, Xu YH, Chai TH, Dong JG, Jiang JY, Dong ZP, 2011. Morphology, damage and control of *Athetis lepigone*. *China Plant Protection*, 31(8): 22–24. [李立涛, 马继芳, 董立, 许佑辉, 柴同海, 董金皋, 姜京宇, 董志平, 2011. 二点委夜蛾的形态、为害及防控. 中国植保导刊, 31(8): 22–24]
- Liang RX, Wang ZY, He KL, Cong B, Li J, 2011. Genetic diversity of geographic populations of *Monolepta hieroglyphica* (Motschulsky) (Coleoptera: Chrysomelidae) from North China estimated by mitochondrial CO II gene sequences. *Acta Entomologica Sinica*, 54(7): 828–837. [梁日霞, 王振营, 何康来, 丛斌, 李菁, 2011. 基于线粒体 CO II 基因序列的双斑长跗萤叶甲中国北方地理种群的遗传多样性研究. 昆虫学报, 54(7): 828–837]
- Librado P, Rozas J, 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451–1452.
- Ma CY, Ma LB, Ni Y, Shen AL, Zhang Y, Zhang FY, Zhao YL, 2010. Phylogenetic relationship of *Thryssa* inferred from morphologic characteristic and mitochondrial 16S rRNA gene sequences. *Journal of Fishery Sciences of China*, 17(3): 471–477. [马春艳, 马凌波, 倪勇, 沈盎绿, 张永, 张凤英, 赵云龙, 2010. 基于形态特征和线粒体 16S rRNA 基因序列探讨棱蛄属的系统进化. 中国渔业科学, 17(3): 471–477]
- Nei M, Kumar S (translated by Lü BZ, Zhong Y, Gao LP *et al.*), 2002. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Higher Education Press, Beijing. [Nei M, Kumar S (吕宝忠, 钟扬, 高莉萍等译), 2002. 分子进化和系统发育. 北京: 高等教育出版社]
- Nikolaevitch PA, Vjatcheslavovna IE, 2003. The Noctuidae (Lepidoptera) of the Daghestan Republic (Russia) II. *Phegea*, 31(4): 167–181.
- Norgate M, Chamings J, Pavlova A, Bull JK, Murray ND, Sunnucks P, 2009. Mitochondrial DNA indicates late Pleistocene divergence of populations of *Heteronympha merope*, an emerging model in environmental change biology. *Public Library of Science One*, 4(11): 1–13.
- Novo M, Almodovar A, Fernandez R, Trigo D, Cosin DJD, 2010. Cryptic speciation of hormogastrid earthworms revealed by mitochondrial and nuclear data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56: 507–512.
- Ren ZM, Ma EB, Guo YP, 2002. The studies of the phylogeny of Acridoidea based on mtDNA sequences. *Acta Genetica Sinica*, 29(4): 314–321. [任竹梅, 马恩波, 郭亚平, 2002. 蝗总科部分种类 Cyt b 基因序列及系统进化研究. 遗传学报, 29(4): 314–321]
- Smith MA, Woodley NE, Janzen DH, Hallwachs W, Hebert PDN, 2006. DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 103(10): 3657–3662.
- Tajima F, 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585–595.
- 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. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731–2739.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25: 4876–4882.
- Wang BX, Yang LF, 2002. Phylogenetic utilities of mitochondrial DNA sequences in the study of insect systematics. *Entomological Knowledge*, 39(2): 88–93. [王备新, 杨莲芳, 2002. 线粒体 DNA 序列特点与昆虫系统学研究. 昆虫知识, 39(2): 88–93]
- Wang ZY, Shi J, Dong JG, 2012. Reason analysis on *Proxenus lepigone* outbreak of summer corn region in the Yellow River, Huai and Hai Rivers Plain and the countermeasures suggested. *Journal of Maize Sciences*, 20(1): 132–134. [王振营, 石洁, 董金皋, 2012. 2011 年黄淮海夏玉米区二点委夜蛾暴发危害的原因与防治对策. 玉米科学, 20(1): 132–134]
- Wright S, 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15: 323–334.
- Xu ZH, Chen JL, Cheng DF, Liu Y, 2011. Genetic variation among the geographic population of the grain aphid, *Sitobion avenae* (Hemiptera: Aphididae) in China inferred from mitochondrial CO I gene sequence. *Agricultural Sciences in China*, 10(7): 1041–1048.
- Yang BS, Hou QJ, Wang H, Li XS, Jiang DF, Liu YQ, Qin L, 2009. Sequence variability of CO I gene and genetic differentiation among the geographic populations of *Caligula japonica* (Lepidoptera: Saturniidae) in China. *Acta Entomologica Sinica*, 52(4): 406–412. [杨宝山, 侯庆君, 王欢, 李喜升, 姜德富, 刘彦群, 秦利, 2009. 不同地理种群银杏大蚕蛾 CO I 基因序列变异与遗传分化. 昆虫学报, 52(4): 406–412]
- Zhang WD, Xu MF, Liao L, Yue HY, Chen QW, Chi YL, 2010. Phylogenetic analysis of genus *Coptotermes* (Isoptera: Rhinotermitidae) based on 16S rRNA gene. *Entomotaxonomia*, 32(2): 93–99. [张卫东, 徐森锋, 廖力, 乐海洋, 陈其文, 迟远丽, 2010. 乳白蚁属部分种类 16S rRNA 的分子系统发育关系(等翅目: 鼻白蚁科). 昆虫分类学报, 32(2): 93–99]

(责任编辑: 袁德成)