

浙江茶区茶尺蠖两近缘种的遗传分化及分布

白家赫^{1,2}, 王志博¹, 肖强^{1,*}

(1. 中国农业科学院茶叶研究所, 农业部茶叶质量安全控制重点实验室, 杭州 310008;

2. 中国农业科学院研究生院, 北京 100081)

摘要:【目的】为了揭示浙江省茶区灰茶尺蠖 *Ectropis grisescens* 和小茶尺蠖 *Ectropis obliqua* 两近缘种的分布情况。【方法】利用线粒体细胞色素氧化酶 I (mtCOI) 基因作为分子标记, 对采自浙江省 17 个地点茶园的茶尺蠖 533 个样品进行了鉴定, 并分析了灰茶尺蠖和小茶尺蠖在浙江的地理分布情况。【结果】在调查的 17 个地点中, 11 个地点的茶尺蠖样品全部为灰茶尺蠖, 另外 3 个地点 (安吉、余杭和龙坞) 采集的样品全部为小茶尺蠖, 其余的 3 个地点 (杭州西湖、杭州临安和杭州富阳) 为两近缘种的混发区。【结论】在浙江省茶区, 灰茶尺蠖的分布范围较广, 小茶尺蠖的分布范围较窄, 同时存在两近缘种的混发区。

关键词: 灰茶尺蠖; 小茶尺蠖; 近缘种; 遗传距离; 地理分布; 浙江

中图分类号: S433.4 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2018)06-0741-08

Genetic differentiation and distribution of two sibling species of tea geometrids in tea-growing areas in Zhejiang, eastern China

BAI Jia-He^{1,2}, WANG Zhi-Bo¹, XIAO Qiang^{1,*} (1. Key Laboratory of Tea Quality and Safety Control, Ministry of Agriculture, Tea Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310008, China; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: 【Aim】 To reveal the distribution of the sibling species of *Ectropis grisescens* and *Ectropis obliqua* in tea-growing areas in Zhejiang, eastern China. 【Methods】 A total of 533 specimens of tea geometrids collected from 17 counties in Zhejiang were identified by using mitochondrial cytochrome oxidase (mtCOI) gene as the molecular marker, and the geographical distribution of *E. grisescens* and *E. obliqua* in Zhejiang was also analyzed. 【Results】 The results showed that among the 17 surveyed localities, the tea geometrids from 11 localities in Zhejiang were all identified as *E. grisescens*, those from other three localities (Anji, Yuhang, Longwu) were all *E. obliqua*, and the rest three localities (Xihu, Lin'an and Fuyang districts of Hangzhou) were identified as the co-occurrence areas of the two sibling species. 【Conclusion】 *E. grisescens* is widely distributed in tea-growing areas in Zhejiang, the distribution of *E. obliqua* is narrower, and there exist co-occurrence areas of the two sibling species.

Key words: *Ectropis grisescens*; *Ectropis obliqua*; sibling species; genetic distance; geographical distribution; Zhejiang

灰茶尺蠖 *Ectropis grisescens* 和小茶尺蠖 *Ectropis obliqua* 为近缘种, 同属于鳞翅目 (Lepidoptera) 尺蠖

科 (Geometridae) 灰尺蠖亚科 (Ennominae) 埃尺蠖属 *Ectropis*, 是主要的茶树食叶性害虫, 为害严重时造

基金项目: 浙江省“三农六方”项目 (CTZB-F160728AWZ-SNY1-36); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (1610212017013); 中国农业科学院创新工程 (CAAS-ASTIP-TRICAAS)

作者简介: 白家赫, 女, 1992 年 11 月生, 河南安阳人, 硕士研究生, 研究方向为茶园有害生物综合治理, E-mail: 18810720376@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: xqtea@vip.163.com

收稿日期 Received: 2017-10-25; 接受日期 Accepted: 2018-01-04

成茶叶减产,影响茶叶的品质,给生产带来较大的经济损失(姜楠等, 2014; 毛腾飞等, 2017; Sun *et al.*, 2017)。

因两近缘种外部形态相似、生活习性接近,难以分辨,常将两者统称茶尺蠖。近年来,在使用茶尺蠖核型多角体病毒 (*Ectropis obliqua* nuclear polyhedrosis virus, EoNPV) 进行防治时,出现不同地区防治效果差异性较大的现象(席羽等, 2011)。基于此,Zhang 等(2014)测定了 17 个地理种群茶尺蠖的线粒体部分序列,比较其同源性和序列多态性,构建单倍型分子系统发育树,结果表明茶尺蠖 17 个地理种群聚为两大类群。姜楠等(2014)从形态特征和线粒体细胞色素氧化酶 I (CO I) 基因两个方面,对我国灰茶尺蛾 *Ectropis grisescens* 和小茶尺蠖 *Ectropis obliqua* 的样品进行分析鉴定,明确了茶尺蠖存在灰茶尺蛾和小茶尺蠖两近缘种,同时证实了线粒体 COI 基因的差异能有效鉴定未知个体,为两种茶尺蛾的分布提供了基础依据。在此之前,一直将两种尺蠖当作一个种来研究,使得两者在生物学特性、性信息素组分、病毒种类及分布区域等的研究结果与实际情况存在差异(毛迎新, 2006; 夏英三和万连步, 2014; Yang *et al.*, 2016)。

然而,茶尺蠖两近缘种在浙江省的分布范围以

及其分布特点至今尚不清楚。席羽等(2014)对浙江省衢州和杭州种群茶尺蠖进行形态学观察、生物学特性比较及正反交试验,结果发现浙江茶尺蠖地理种群已分化为不同种,但并未明确不同种的分布范围。王志博等(2017)通过实地查看和问卷发放对浙江省 35 个重要产茶市、县、区和 47 个茶叶企业所属茶园的茶尺蠖发生情况进行了调查,结果表明在 33 个市县区均有茶尺蠖发生。本研究采用 mtCO I 基因作为分子标记,拟通过扩增浙江省不同地区的茶尺蠖两近缘种的线粒体基因序列,对浙江省各市县茶尺蠖种群进行系统分析和比较,以期明确浙江省茶尺蠖两近缘种的分布范围和分布方式,为茶尺蠖的综合防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试虫采集

本实验所用样品主要从茶尺蠖发生的地理区域采集,采集信息如表 1 所示。茶尺蠖的不同地理种群主要采用采集幼虫的方式收集,部分成虫采用性诱剂和灯诱方式收集。用于鉴定的分析虫样存放于 -80°C 冰箱冷冻或用无水乙醇保存。

表 1 浙江省各地茶尺蠖样品采集信息

Table 1 Collecting information of samples of tea geometrids in Zhejiang, China

种群代码 Population code	采集地点 Sampling locality	采集日期 Collecting date	经纬度 Longitude and latitude	鉴定虫数 Number of specimens	灰茶尺蛾个体数 Individual number of <i>Ectropis grisescens</i>	小茶尺蠖个体数 Individual number of <i>Ectropis obliqua</i>
HZAJ	湖州安吉 Anji, Huzhou	2012.05	119.67°E, 30.64°N	28	0	28
HZYH	杭州余杭 Yuhang, Hangzhou	2017.05	120.28°E, 30.41°N	42	0	42
HZLW	杭州龙坞 Longwu, Hangzhou	2017.08	120.03°E, 30.18°N	27	0	27
HZXH	杭州西湖 Xihu, Hangzhou	2017.06	120.08°E, 30.20°N	60	5	55
HZLA	杭州临安 Lin'an, Hangzhou	2017.05	119.38°E, 30.16°N	44	25	19
HZFY	杭州富阳 Fuyang, Hangzhou	2016.10	119.72°E, 29.96°N	33	25	8
HZCA	杭州淳安 Chun'an, Hangzhou	2016.09	118.67°E, 29.39°N	25	25	0
SXKQ	绍兴柯桥 Keqiao, Shaoxing	2017.05	120.70°E, 29.93°N	38	38	0
SXXC	绍兴新昌 Xinchang, Shaoxing	2017.05	120.89°E, 29.50°N	36	36	0
NBXS	宁波象山 Xiangshan, Ningbo	2016.09	121.85°E, 29.41°N	29	29	0
NBNH	宁波宁海 Ninghai, Ningbo	2016.09	121.45°E, 29.32°N	37	37	0
JHWY	金华武义 Wuyi, Jinhua	2017.10	119.70°E, 28.93°N	32	32	0
TZLH	台州临海 Linhai, Taizhou	2016.09	121.10°E, 28.82°N	31	31	0
QZLY	衢州龙游 Longyou, Quzhou	2011.05	119.18°E, 29.08°N	4	4	0
LSSY	丽水松阳 Songyang, Lishui	2012.05	119.38°E, 28.50°N	25	25	0
WZTS	温州泰顺 Taishun, Wenzhou	2017.07	119.70°E, 27.55°N	30	30	0
ZSDH	舟山定海 Dinghai, Zhoushan	2017.09	122.37°E, 29.97°N	12	12	0

1.2 茶尺蠖 DNA 的提取

茶尺蠖 DNA 的提取方法采用试剂盒提取。向装有茶尺蠖样本的灭菌干净离心管中加入 1 颗直径为 4 mm 的无菌钢珠,置于震荡研磨器中,研磨 1 min。待样品充分研磨后,根据血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒(天根公司,北京)的方法,逐步提取样品 DNA,置于 -20℃ 保存备用。

1.3 基于 mtCOI 基因的茶尺蠖种类鉴定

以茶尺蠖基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。其中,PCR 扩增引物、反应体系及反应程序参照姜楠等(2014)。每次 PCR 过程都以水为阴性对照。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶检测,之后由杭州擎科梓熙生物技术有限公司进行双向测序。

1.4 序列分析和构建系统发育树

将测序结果通过软件 Seqman 5.01 (DNASTAR Inc.,1996)进行拼接。登录 NCBI 网站,查阅并下载相关的灰茶尺蛾和小茶尺蠖 mtCO I 基因片段序列(表 2),用软件 ClustalX 1.83 将浙江省各地区茶尺蠖的 CO I 序列(当同一地理种群存在相同序列时,则选取其中一条)和已下载的茶尺蠖两近缘种的 CO I 序列进行比对。采用 DNASTar 软件中的 MegAlign-Clustal W 模型计算出茶尺蠖不同地理种群的进化分歧矩阵。用 MEGA 5.0 软件,基于 Kimura 2-paramter 模型,以茶银尺蠖 *Scopula subpunctaria* 为外群,构建 NJ 树(neighbour-joining tree),系统树各分支的置信度(bootstrap)均进行 1 000 次的重复检验。

表 2 引用的 mtCO I 基因片段在 GenBank 中的登录号

Table 2 GenBank accession numbers of the reference mtCOI gene sequences

序列代码 Sequence code	地理种群 Geographical population	物种 Species	GenBank 登录号 GenBank accession no.
HNCS-KJ704328	湖南长沙 Changsha, Hunan	灰茶尺蛾 <i>Ectropis grisescens</i>	KJ704328
ZJQZ-KJ704330	浙江衢州 Quzhou, Zhejiang	灰茶尺蛾 <i>E. grisescens</i>	KJ704330
AHQS-KJ704331	安徽潜山 Qianshan, Anhui	灰茶尺蛾 <i>E. grisescens</i>	KJ704331
FJWYS-KJ704333	福建武夷山 Wuyishan, Fujian	灰茶尺蛾 <i>E. grisescens</i>	KJ704333
HBWH-KJ704334	湖北武汉 Wuhan, Hubei	灰茶尺蛾 <i>E. grisescens</i>	KJ704334
JXNC-KJ704345	江西南昌 Nanchang, Jiangxi	灰茶尺蛾 <i>E. grisescens</i>	KJ704345
HNXY-KJ704347	河南信阳 Xinyang, Henan	灰茶尺蛾 <i>E. grisescens</i>	KJ704347
JSYX-KJ704329	江苏宜兴 Yixing, Jiangsu	小茶尺蠖 <i>Ectropis obliqua</i>	KJ704329
AHSZZ-KJ704332	安徽十字镇 Shizizhen, Anhui	小茶尺蠖 <i>E. obliqua</i>	KJ704332
ZJHZ-KJ704339	浙江杭州 Hangzhou, Zhejiang	小茶尺蠖 <i>E. obliqua</i>	KJ704339

2 结果

2.1 基于 mtCO I 基因的灰茶尺蛾和小茶尺蠖的遗传分化分析

采用 DNASTar 软件中的 MegAlign-ClustalW 模型计算出茶尺蠖不同地理种群的进化分歧矩阵(同一地理种群 mtCO I 基因序列相同时则选取一条作为该地点的代表)。灰茶尺蛾和小茶尺蠖的种间遗传距离为 3.9%~4.0%,远小于两近缘种与外群银茶尺蠖 10.1%~10.3% 的遗传距离。其中,灰茶尺蛾不同地理种群间的遗传距离为 0.0%,小茶尺蠖不同地理种群间的遗传距离为 0.0%~0.3%,每个种的种内遗传距离远小于种间遗传距离(表 3)。

2.2 灰茶尺蛾和小茶尺蠖不同地理种群的系统发育树分析

同一地点的茶尺蠖 mtCO I 基因序列相同时则选取一条作为该地点的代表,并基于 Kimura 2-

parameter,采用 MEGA 5.0 软件构建系统进化树(图 1)。结果发现,灰茶尺蛾和小茶尺蠖形成 2 个分支;在灰茶尺蛾分支中,被测样品 ZSDH, HZCA, NBNH, SXXC, HZLA-1, TZLH, JHWY, SXXQ, WZTS, HZFY-2, HZXH-1, LSSY, NBXS 和 QZLY 与 JXNC-KJ704345, HBWH-KJ704334, FJWYS-KJ704333, AHQS-KJ704331, ZJQZ-KJ704330, HNCS-KJ704328 和 HNXY-KJ704347 7 个已知灰茶尺蛾种群聚为一类;而在小茶尺蠖分支中,被测样本 HZFY-1, HZYH, HZAJ, HZLA-2, HZLW 和 HZXH-2 与 JSYX-KJ704329 和 ZJHZ-KJ704339 2 个已知小茶尺蠖种群先聚为一类,再与 AHSZZ-KJ704332 聚在一起。系统发育树的结果与遗传距离的结果相一致。

从构建的系统发育树可以看出,杭州西湖、杭州临安和杭州富阳地区中既有与灰茶尺蛾聚为一类的个体,同时又有与小茶尺蠖聚为一类的个体,这说明杭州西湖区、杭州临安区和杭州富阳区为灰茶尺蛾和小茶尺蠖的混发区。

表 3 茶尺蠖种群 mtCOI 基因片段序列与参比序列的一致性
Table 3 Identity of the COI sequences of tea geometrid collections with reference sequences

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
1	100.0	99.8	99.8	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	90.5
2	0.0	99.8	99.8	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	90.5
3	0.2	0.2	99.7	99.8	99.8	99.8	100.0	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	90.5
4	0.2	0.2	0.3	99.8	99.8	99.8	99.8	99.7	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	90.5
5	0.0	0.0	0.2	0.2	100.0	100.0	100.0	99.8	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	90.4
6	0.0	0.0	0.2	0.2	0.0	100.0	100.0	99.8	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	90.4
7	0.0	0.0	0.2	0.2	0.0	0.0	100.0	99.8	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	90.5
8	0.0	0.0	0.2	0.2	0.0	0.0	99.8	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	90.4
9	0.2	0.2	0.0	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	90.5
10	3.9	3.9	4.0	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	4.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	90.5
11	3.9	3.9	4.0	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	4.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	90.5
12	3.9	3.9	4.0	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	4.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	90.5
13	3.9	3.9	4.0	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	4.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	90.5
14	3.9	3.9	4.0	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	90.5
15	3.9	3.9	4.0	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	90.5
16	3.9	3.9	4.0	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	90.5
17	3.9	3.9	4.0	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	90.5
18	3.9	3.9	4.0	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	90.5
19	3.9	3.9	4.0	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	90.5
20	3.9	3.9	4.0	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	90.5
21	3.9	3.9	4.0	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	90.5
22	3.9	3.9	4.0	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	90.5
23	3.9	3.9	4.0	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	90.5
24	3.9	3.9	4.0	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	90.5
25	3.9	3.9	4.0	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	90.5
26	3.9	3.9	4.0	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	90.5
27	3.9	3.9	4.0	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	90.5
28	3.9	3.9	4.0	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	90.5
29	3.9	3.9	4.0	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	90.5
30	3.9	3.9	4.0	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	90.5
31	10.1	10.1	10.3	10.3	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1

差异性 Divergence

1: JSVX-KJ704329 (江苏宜兴, 小茶尺蠖 Yixing, Jiangsu, *Ectropis obliqua*); 2: ZJHZ-KJ704339 (浙江杭州, 小茶尺蠖 Hangzhou, Zhejiang, *Ectropis obliqua*); 3: HZLW (杭州龙坞 Longwu, Hangzhou); 4: AHSZZ-KJ704332 (安徽十字镇, 小茶尺蠖 Shizizhen, Anhui, *Ectropis obliqua*); 5: HZFY-1 (杭州富阳-1 Fuyang, Hangzhou); 6: HZYH (杭州余杭 Yuhang, Hangzhou); 7: HZAJ (湖州安吉 Anji, Huzhou); 8: HZLA-2 (杭州临安-2 Lin'an, Hangzhou-2); 9: HZXH-2 (杭州西湖-2 Xihu, Hangzhou-2); 10: JHWY (金华武义 Wuyi, Jinhua); 11: HNXV-KJ704347 (河南信阳, 灰茶尺蠖 Xinyang, Henan, *Ectropis griseascens*); 12: HNGS-KJ704328 (湖南长沙, 灰茶尺蠖 Changsha, Hunan, *Ectropis griseascens*); 13: ZJQZ-KJ704330 (浙江衢州, 灰茶尺蠖 Quzhou, Zhejiang, *Ectropis griseascens*); 14: AHQS-KJ704331 (安徽潜山, 灰茶尺蠖 Qianshan, Anhui, *Ectropis griseascens*); 15: FJWYS-KJ704333 (福建武夷山, 灰茶尺蠖 Wuyishan, Fujian, *Ectropis griseascens*); 16: HBWH-KJ704334 (湖北武汉, 灰茶尺蠖 Wuhan, Hubei, *Ectropis griseascens*); 17: JXNC-KJ704345 (江西南昌, 灰茶尺蠖 Nanchang, Jiangxi, *Ectropis griseascens*); 18: TZLH (台州临海 Linhai, Taizhou); 19: HZLA-1 (杭州临安-1 Lin'an Hangzhou-1); 20: SXXC (绍兴新昌 Xinchang, Shaoxing); 21: NBNH (宁波宁海 Ninghai, Ningbo); 22: ZSDH (舟山定海 Dinghai, Zhoushan); 23: HZCA (杭州淳安 Chun'an, Hangzhou); 24: SXKQ (绍兴柯桥 Keqiao, Shaoxing); 25: WZTS (温州泰顺 Taishun, Wenzhou); 26: HZFY-2 (杭州富阳-2 Fuyang, Hangzhou-2); 27: HZXH-1 (杭州西湖区-1 Xihu, Hangzhou-1); 28: LSSY (丽水松阳 Songyang, Lishui); 29: NBXS (宁波象山 Xiangshan, Ningbo); 30: QZLY (衢州龙游 Longyou, Quzhou); 31: 茶银尺蠖 *Scopula subpunctaria*.

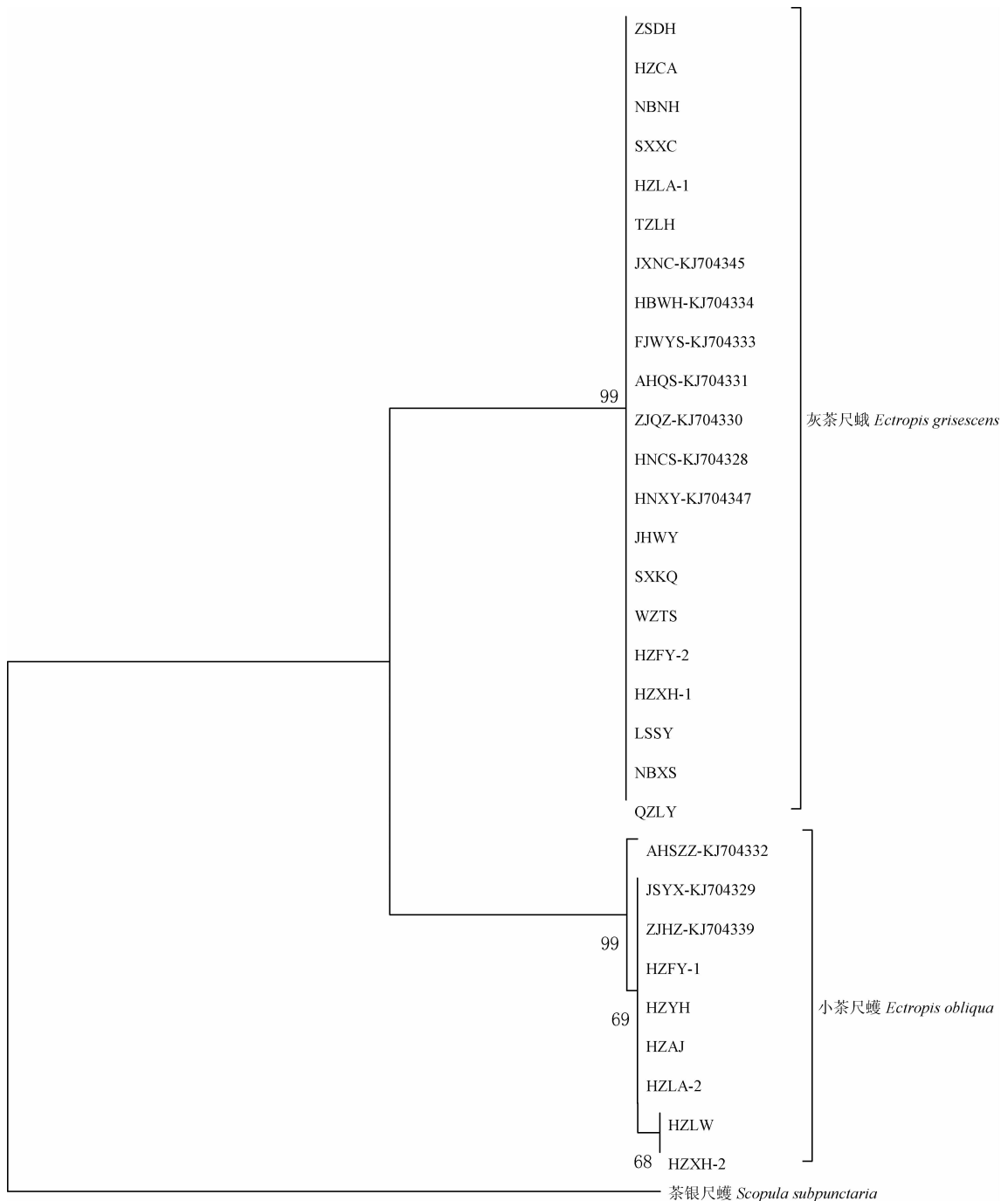


图 1 基于 CO I 序列和 K2P 模型构建的茶尺蠖不同地理种群的 NJ 树

Fig. 1 Neighbour-joining (NJ) tree of tea geometrids based on CO I sequence and Kimura-2-parameter model

ZSDH: 舟山定海 Dinghai, Zhoushan; HZCA: 杭州淳安 Chun'an, Hangzhou; NBNH: 宁波宁海 Ninghai, Ningbo; SXXC: 绍兴新昌 Xinchang, Shaoxing; HZLA-1: 杭州临安-1 Lin'an, Hangzhou-1; TZLH: 台州临海 Linhai, Taizhou; JXNC-KJ704345: 江西南昌, 灰茶尺蠖 Nanchang, Jiangxi, *Ectropis grisescens*; HBWH-KJ704334: 湖北武汉, 灰茶尺蠖 Wuhan, Hubei, *Ectropis grisescens*; FJWYS-KJ704333: 福建武夷山, 灰茶尺蠖 Wuyishan, Fujian, *Ectropis grisescens*; AHQS-KJ704331: 安徽潜山, 灰茶尺蠖 Qianshan, Anhui, *Ectropis grisescens*; ZJQZ-KJ704330: 浙江衢州, 灰茶尺蠖 Quzhou, Zhejiang, *Ectropis grisescens*; HNCS-KJ704328: 湖南长沙, 灰茶尺蠖 Changsha, Hunan, *Ectropis grisescens*; HNXH-KJ704347: 河南信阳, 灰茶尺蠖 Xinyang, Henan, *Ectropis grisescens*; JHWY: 金华武义 Wuyi, Jinhua; SXXQ: 绍兴柯桥 Keqiao, Shaoxing; WZTS: 温州泰顺 Taishun, Wenzhou; HZFY-2: 杭州富阳-2 Fuyang, Hangzhou-2; HZXH-1: 杭州西湖-1 Xihu, Hangzhou-1; LSSY: 丽水松阳 Songyang, Lishui; NBXS: 宁波象山 Xiangshan, Ningbo; QZLY: 衢州龙游 Longyou, Quzhou; AHSZZ-KJ704332: 安徽十字镇, 小茶尺蠖 Shizizhen, Anhui, *Ectropis obliqua*; JSYX-KJ704329: 江苏宜兴, 小茶尺蠖 Yixing, Jiangsu, *Ectropis obliqua*; ZJHZ-KJ704339: 浙江杭州, 小茶尺蠖 Hangzhou, Zhejiang, *Ectropis obliqua*; HZFY-1: 杭州富阳-1 Fuyang, Hangzhou-1; HZYH: 杭州余杭 Yuhang, Hangzhou; HZAJ: 湖州安吉 Anji, Hangzhou; HZLA-2: 杭州临安-2 Lin'an, Hangzhou-2; HZLW: 杭州龙坞 Longwu, Hangzhou; HZXH-2: 杭州西湖-2 Xihu, Hangzhou-2. 图中分支上为自举检验支持率。Bootstrap percentages are shown on the clades.

2.3 灰茶尺蛾和小茶尺蠖的地理分布

经过对浙江省不同地区茶尺蠖两近缘种灰茶尺蛾和小茶尺蠖 mtCO I 基因的扩增表明,PCR 产物大小约为 650 bp。通过 ClustalX 1.83 多序列比对程序将本实验所得到的浙江地区茶尺蠖不同地理种群和代表性地理种群茶尺蠖的 mtCO I 基因序列进行对比(序列相同时,则选取其中的 1 条),从中截取 600 bp 保存并进行分析。结果表明,浙江茶

区大部分茶园发生的是灰茶尺蛾,广泛分布在杭州淳安、绍兴柯桥、绍兴新昌、宁波象山、宁波宁海、金华武义、台州临海、衢州龙游、丽水松阳、温州泰顺及舟山定海;小茶尺蠖发生区域较窄,目前仅在湖州安吉、杭州余杭和杭州龙坞发现;同时发现存在两近缘种的混发区域,但仅在灰茶尺蛾和小茶尺蠖的发生区域之间的杭州西湖、富阳和临安(图 2)。

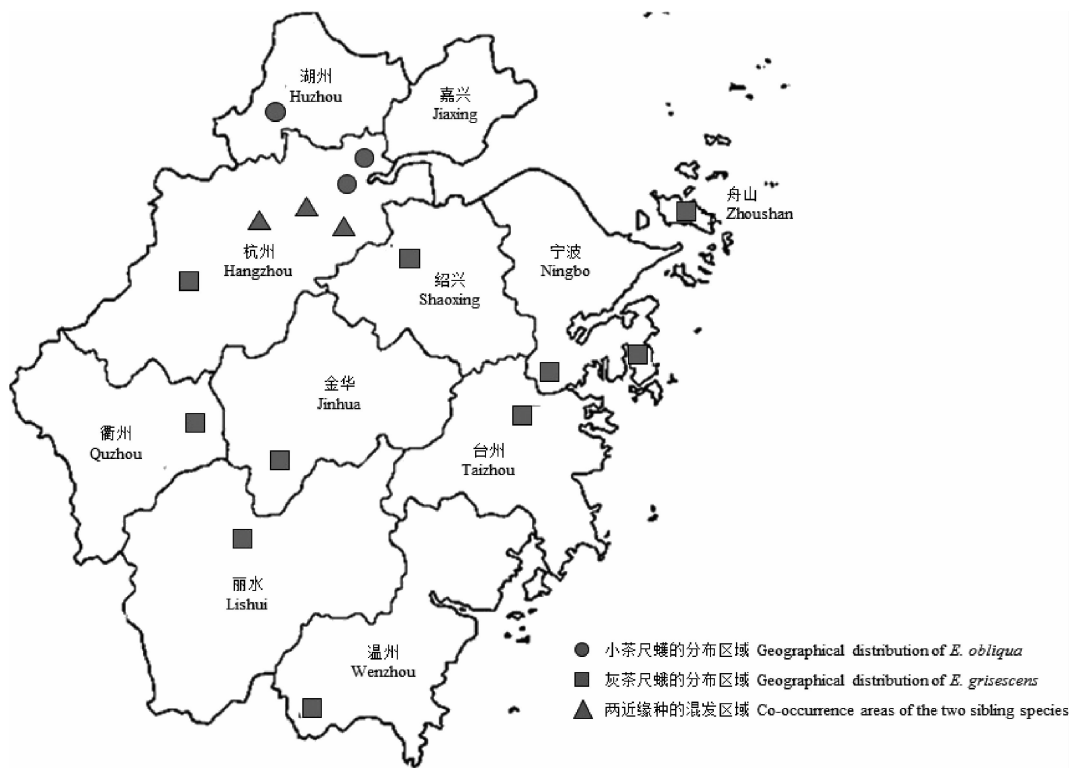


图 2 浙江地区灰茶尺蛾和小茶尺蠖的地理分布

Fig. 2 Geographical distribution of the closely related tea geometrid species *Ectropis grisescens* and *Ectropis obliqua* in Zhejiang, China

地图轮廓来源于 R 语言软件制作,其他均为手动添加。The map outlines were from R language software, and the rest were added manually.

3 讨论

随着分子生物学的发展,线粒体基因作为分子标记,具有较高的突变性和母系遗传特点,进化速率常常较核基因快,已广泛用于昆虫系统发育分析中,为揭示种群的遗传分化及系统发育研究提供了有力的证据 (Blaxter, 2003; Marshall, 2005)。但 DNA 分子手段检测到的遗传差异并不能说明物种之间存在生殖隔离 (黄华等, 2012)。因此,采用分子标记,结合经典形态学分类能够更好地揭示近缘种的存在。CO I 基因是全球性物种鉴别系统的通用序列。

罗晨等(2002)利用 mtDNA CO I 基因作分子标记,鉴定了 5 个烟粉虱 *Bemisia tabaci* 种群的生物型。付建玉等(2014)首次通过 mtDNA CO I 基因序列分析,研究了茶小绿叶蝉 *Empoasca vitis* 的遗传结构及其与其他叶蝉的系统进化关系。廖力等(2012)应用 DNA 条形码技术成功鉴别近缘种类谷实夜蛾 *Helicoverpa zea* 和棉铃虫 *Helicoverpa armigera*。王蒙等(2014)通过线粒体 CO I 基因,对我国不同地理种群的桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 基因信息、遗传多样性和种群亲缘关系进行了研究。灰茶尺蛾和小茶尺蠖由于外部形态和食性十分相近,生物学习性和发生规律极其相似,难以分辨,长期以来一直将两

近缘种作为一个物种来认识。分子生物学鉴定技术的形成与发展,为昆虫近缘种的区分提供了新的方法。姜楠等(2014)采用形态学和利用线粒体 CO I 基因作为分子标记的方法成功将灰茶尺蠖和小茶尺蠖进行了有效的区分,为明确两近缘种在我国分布和开展精准防控技术的研究提供了基础。

浙江省是我国重点产茶省,也是茶尺蠖的主要发生区域(周子康, 1986; 王志博等, 2017)。席羽等(2014)通过形态学和遗传学的方法,发现浙江省茶尺蠖地理种群已分化为不同种。但当时尚未明确茶尺蠖存在哪些不同的种,因此也无法开展不同种在浙江省的分布研究。鉴于现已明确茶园存在灰茶尺蠖和小茶尺蠖两近缘种,本研究通过多点大范围收集茶尺蠖地理种群,采用 mtDNA CO I 基因作为分子标记鉴定明确了浙江省两近缘种茶尺蠖的分布现状。从鉴定的结果可以看出,灰茶尺蠖广泛分布于浙江的杭州、绍兴、宁波、金华、衢州、台州、丽水、舟山、温州等市,而小茶尺蠖分布范围较窄,目前仅在杭州和湖州两市有分布。

进一步的分析还发现,灰茶尺蠖和小茶尺蠖的发生区域之间的杭州西湖、富阳和临安存在两近缘种的混发区且呈带状分布,而不是像通常所认为的不同种类害虫的混发在其适生区域一般是随处可见的。根据竞争排斥原理,生态位相同的两个物种,由于食物、空间等资源的竞争,一个物种在竞争中会被排斥或被取代(牛翠娟等, 2007)。研究发现,竞争是由多个因素引起的,如生态位、寄主适应能力差异(Tsueda and Tsuchida, 2011; Jiao *et al.*, 2014)、非对称交配互作(Liu *et al.*, 2007)、逆境适应能力(崔旭红等, 2009)及共生菌差异(褚栋等, 2006)等。生殖干扰是竞争取代的重要机制,主要是通过竞争对方雌性个体实现的,是一种不直接导致死亡的干扰方式(Reitz and Trumble, 2002)。入侵 B 隐种烟粉虱对土著烟粉虱的交配行为产生干扰就是一个案例,它使得后者逐步被取代(Liu *et al.*, 2007)。Zhang 等(2016)研究认为,灰茶尺蠖雄虫对小茶尺蠖的雌虫具有强烈的吸引作用,两者存在非对称交配行为,混合种群的发生量会明显减少。茶尺蠖两近缘种间的非对称交配行为,是否意味着只有在灰茶尺蠖和小茶尺蠖分布交叉的边界存在混发区,而在非交叉区域则是相对独立的?同时,现有研究还表明携带内共生菌的烟粉虱比不携带菌的烟粉虱有更大的体型、更快的发育速率和更强的繁殖能力,进而增强其竞争能力(褚栋等, 2006)。而灰茶尺蠖和

小茶尺蠖的内共生菌也存在差异(周孝贵等, 2016),且灰茶尺蠖较小茶尺蠖具有更短的发育历期和更强的繁殖能力,是否由此导致了目前灰茶尺蠖和小茶尺蠖的特殊分布方式,也有待今后作进一步深入研究。

本研究揭示了灰茶尺蠖和小茶尺蠖在浙江的分布区域,作为我国茶叶最主要的食叶类害虫,还有必要进一步研究明确茶尺蠖两近缘种在我国整个茶区的分布区域,持续监测茶尺蠖两近缘种的混发区种群数量动态和发生区域的变化,这可为研究茶尺蠖两近缘种的地理分布存在差异的原因、近缘种间是否存在基因交流及物种的形成提供基础,同时也能针对两近缘种的发生状况及分布区域变化提出更精准的防治策略。

参考文献 (References)

- Blaxter M, 2003. Counting angels with DNA. *Nature*, 421 (6919): 122 - 124.
- Chu D, Liu GX, Tao YL, Zhang YJ, 2006. Diversity of endosymbionts in *Bemisia tabaci* (Gennadius) complex and their biological implications. *Acta Entomol. Sin.*, 49(4): 687 - 694. [褚栋, 刘国霞, 陶玉荔, 张友军, 2006. 烟粉虱复合种内共生菌多样性及其生物学意义. *昆虫学报*, 49(4): 687 - 694]
- Cui XH, Zheng D, Pu GL, Liu WX, 2009. Effects of temperature on development, survival and fecundity of B- and Q-biotypes of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *J. Plant. Prot.*, 36(6): 571 - 572. [崔旭红, 郑丹, 蒲桂林, 刘万学, 2009. 温度对 B 型、Q 型烟粉虱生长发育、存活和繁殖的影响. *植物保护学报*, 36(6): 571 - 572]
- Fu JY, Li L, Yuan ZJ, Tang MJ, Xiao Q, 2014. Molecular phylogenetic analysis of tea green leafhopper (*Empoasca vitis*) based on mtDNA *COI* sequences. *J. Tea Sci.*, 34(6): 601 - 608. [付建玉, 李乐, 袁志军, 唐美君, 肖强, 2014. 基于 mtDNA *COI* 的假眼小绿叶蝉系统发育研究. *茶叶科学*, 34(6): 601 - 608]
- Huang H, Zheng RQ, Zhang JY, Chen W, Yu XY, Chen P, 2012. A review of cryptic species in amphibians. *Chin. Bull. Life Sci.*, 24(5): 483 - 491. [黄华, 郑荣泉, 张加勇, 陈雯, 于晓云, 陈平, 2012. 隐种及其在两栖动物中的研究进展. *生命科学*, 24(5): 483 - 491]
- Jiang N, Liu SX, Xue DY, Tang MJ, Xiao Q, Han HX, 2014. External morphology and molecular identification of two tea geometrid moth from southern China. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 51(4): 987 - 1002. [姜楠, 刘淑仙, 薛大勇, 唐美君, 肖强, 韩红香, 2014. 我国华东地区两种茶尺蠖的形态和分子鉴定. *应用昆虫学报*, 51(4): 987 - 1002]
- Jiao XG, Xie W, Guo LT, Zhang YJ, 2014. Differing effects of cabbage and pepper on B and Q putative species of *Bemisia tabaci*. *J. Pest Sci.*, 87(4): 629 - 637.
- Liao L, Xu MF, Zhang WD, Chi YL, Huang GH, 2012. Using DNA

- barcodes to identify two morphologically alike species; the cotton bollworm and corn earworm. *Plant Quar.*, 26(6): 12–16. [廖力, 徐森锋, 张卫东, 迟远丽, 黄国华, 2012. 应用 DNA 条形码技术鉴别谷实夜蛾与棉铃虫. *植物检疫*, 26(6): 12–16]
- Liu SS, De Barro PJ, Xu J, Luan JB, Zang LS, Ruan YM, Wan FH, 2007. Asymmetric mating interactions drive widespread invasion and displacement in a whitefly. *Science*, 318(5857): 1769–1772.
- Luo C, Yao Y, Wang RJ, Yan FM, Hu DX, Zhang ZL, 2002. The use of mitochondrial cytochrome oxidase I (mt COI) gene sequences for the identification of biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) in China. *Acta Entomol. Sin.*, 45(6): 759–763. [罗晨, 姚远, 王戎疆, 阎凤鸣, 胡敦孝, 张芝利, 2002. 利用 mtDNA CO I 基因序列鉴定我国烟粉虱的生物型. *昆虫学报*, 45(6): 759–763]
- Mao TF, Fu JY, Sun L, Zhou XG, Bai JH, Xiao Q, 2017. The expression of the antibacterial peptide genes from two sibling species of tea geometrid was different in resistance to EoNPV infection. *Chin. J. Biol. Control*, 33(4): 472–480. [毛腾飞, 付建玉, 孙亮, 周孝贵, 白家赫, 肖强, 2017. 两近缘种茶尺蠖的抗菌肽基因在抵抗 EoNPV 感染过程中的表达差异. *中国生物防治学报*, 33(4): 472–480]
- Mao YX, Liu MY, Wang YP, Gong ZM, 2007. The pathogenicity of *Ectropis grisescens* nucleopolyhedrovirus on the larvae of *Ectropis grisescens*. *Entomol. J. East China*, 16(3): 216–219. [毛迎新, 刘明炎, 王友平, 龚自明, 2007. 灰茶尺蠖核型多角体病毒对灰茶尺蠖的致病性研究. *华东昆虫学报*, 16(3): 216–219]
- Marshall E, 2005. Will DNA bar codes breathe life into classification? *Science*, 307(5712): 1037.
- Niu CJ, Lou AR, Sun RY, 2007. *Basic Ecology*. 2nd ed. Higher Education Press, Beijing. [牛翠娟, 娄安如, 孙儒泳, 2007. 基础生态学(第2版). 北京: 高等教育出版社]
- Reitz SR, Trumble JT, 2002. Competitive displacement among insects and arachnids. *Annu. Rev. Entomol.*, 47: 435–465.
- Sun L, Mao TF, Zhang YX, Wu JJ, Bai JH, Zhang YN, Jiang XC, Yin KS, Guo YY, Zhang YJ, Xiao Q, 2017. Characterization of candidate odorant-binding proteins and chemosensory proteins in the tea geometrid *Ectropis obliqua* Prout (Lepidoptera: Geometridae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 94(9): e21383.
- Tsueda H, Tsuchida K, 2011. Reproductive differences between Q and B whiteflies, *Bemisia tabaci*, on three host plants and negative interactions in mixed cohorts. *Entomol. Exp. Appl.*, 141(3): 197–207.
- Wang M, Xu L, Zhang RJ, Zhang GM, Yu DJ, 2014. Population genetic differentiation analysis of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) based on mtDNA COI gene. *Acta Entomol. Sin.*, 57(12): 1424–1438. [王蒙, 徐浪, 张润杰, 章桂明, 余道坚, 2014. 基于线粒体 COI 基因的桔小实蝇种群遗传分化研究. *昆虫学报*, 57(12): 1424–1438]
- Wang ZB, Mao TF, Bai JH, Xiao Q, 2017. An investigation on occurrence of tea looper (Lepidoptera: Geometridae) in Zhejiang Province in 2016. *J. Tea*, 43(2): 71–73. [王志博, 毛腾飞, 白家赫, 肖强, 2017. 浙江省 2016 年茶尺蠖发生情况调查. *茶叶*, 43(2): 71–73]
- Xi Y, Yin KS, Tang MJ, Xiao Q, 2014. Geographic populations of the tea geometrid, *Ectropis obliqua* (Lepidoptera: Geometridae) in Zhejiang, eastern China have differentiated into different species. *Acta Entomol. Sin.*, 57(9): 1117–1122. [席羽, 殷坤山, 唐美君, 肖强, 2014. 浙江茶尺蠖地理种群已分化成为不同种. *昆虫学报*, 57(9): 1117–1122]
- Xi Y, Yin KS, Xiao Q, 2011. The susceptibility difference against EoNPV in different geographic populations of tea geometrid (*Ectropis obliqua* Prout). *J. Tea Sci.*, 31(2): 100–104. [席羽, 殷坤山, 肖强, 2011. 不同地理种群茶尺蠖对 EoNPV 的敏感性差异研究. *茶叶科学*, 31(2): 100–104]
- Xia YS, Wan LB, 2014. Preliminary study on the biological characteristics of *Ectropis obliqua* Prout. *J. Anhui Agric. Sci.*, 42(29): 10175–10176. [夏英三, 万连步, 2014. 茶尺蠖生物学特性初步研究. *安徽农业科学*, 42(29): 10175–10176]
- Yang Y, Zhang L, Guo F, Long Y, Wang Y, Wan X, 2016. Reidentification of sex pheromones of tea Geometrid *Ectropis obliqua* Prout (Lepidoptera: Geometridae). *J. Econ. Entomol.*, 109(1): 167–175.
- Zhang GH, Yuan ZJ, Yin KS, Fu JY, Tang MJ, Xiao Q, 2016. Asymmetrical reproductive interference between two sibling species of tea looper: *Ectropis grisescens* and *Ectropis obliqua*. *Bull. Entomol. Res.*, doi: 10.1017/S0007485316000602.
- Zhang GH, Yuan ZJ, Zhang CX, Yin KS, Tang MJ, Guo HW, Fu JY, Xiao Q, 2014. Detecting deep divergence in seventeen populations of tea geometrid (*Ectropis obliqua* Prout) in China by COI mtDNA and cross-breeding. *PLoS ONE*, 9(6): e99373.
- Zhou XG, Fu JY, Liu SA, Mao TF, Xiao Q, Chen XX, 2016. Molecular detection and sequence analysis of *Wolbachia* strains in *Ectropis obliqua* and *Ectropis grisescens* (Lepidoptera: Geometridae). *Chin. J. Appl. Entomol.*, 53(4): 782–792. [周孝贵, 付建玉, 刘守安, 毛腾飞, 肖强, 陈学新, 2016. 茶尺蠖和灰茶尺蠖内共生菌 *Wolbachia* 的分子检测及序列分析. *应用昆虫学报*, 53(4): 782–792]
- Zhou ZK, 1986. Vertical ecoclimatic layers in hilly regions of Zhejiang province and tea production. *Chin. J. Ecol.*, 5(4): 16–19. [周子康, 1986. 浙江丘陵山地茶树生态气候的垂直层和茶叶生产. *生态学杂志*, 5(4): 16–19]