

# 基于线粒体 *COI* 基因序列的大豆食心虫 不同地理种群遗传分化

史树森\* 崔娟 朱诗禹 徐伟 王小奇

(吉林农业大学农学院, 大豆区域技术创新中心, 长春 130118)

**摘要:** 为揭示大豆食心虫 *Leguminivora glycinivorella* 不同地理种群间的遗传分化情况, 通过测定 19 个地理种群 214 头老熟幼虫的线粒体 *COI* 基因序列, 利用 MEGA 6.0 和 DnaSP 5.0 软件对不同地理种群间序列变异和遗传分化进行分析。结果表明, 在 214 条 408 bp 的 *COI* 基因序列中发现 46 个变异位点, 获得 49 种单倍型。总群体单倍型多样性为 0.8277, 固定系数为 0.59, 基因流为 0.17。总群体 Tajima's D 检验结果不显著, 说明在较近时间内大豆食心虫未经历群体扩张。大豆食心虫不同地理种群间基因交流较少, 贵阳种群、都安种群与其它地理种群分化明显, 整体的遗传多样性和遗传分化程度较高, 地理距离是影响不同地理种群间遗传距离的重要因素。

**关键词:** 大豆食心虫; 线粒体 *COI* 基因; 地理种群; 遗传分化; 基因流

## Genetic differentiation among geographic populations of *Leguminivora glycinivorella* (Lepidoptera: Olethreutidae) based on mitochondrial *COI* gene sequences

Shi Shusen\* Cui Juan Zhu Shiyu Xu Wei Wang Xiaoqi

(Innovation Center of Soybean Regional Technology, College of Agriculture, Jilin Agricultural University,  
Changchun 130118, Jilin Province, China)

**Abstract:** In order to reveal the genetic differentiation among different geographic populations of *Leguminivora glycinivorella*, the gene sequences of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (*COI*) from 214 mature larval individuals of 19 geographic populations were analyzed, and the genetic differentiation and sequence variations were analyzed using MEGA 6.0 and DnaSP 5.0. The results showed that, among the 408 bp alignment of 214 *COI* sequences, 46 variable sites and 49 haplotypes were identified. The diversity index, total fixed coefficient and total gene flow of total haplotypes were 0.8277, 0.59 and 0.17, respectively. No difference in Tajima's D test among different populations indicated that there might be no population expansion in recent history of *L. glycinivorella*. It revealed that there was less gene flow among different geographic populations of *L. glycinivorella*. The Guiyang and Du'an populations showed obvious observed genetic differentiation with other populations. The whole genetic diversity and the genetic differentiation were higher. The geographic distance had important influence on the genetic distance of different geographic populations of *L. glycinivorella*.

**Key words:** *Leguminivora glycinivorella*; mitochondrial *COI* gene sequence; geographic population; genetic differentiation; gene flow

大豆食心虫 *Leguminivora glycinivorella* 又名大豆蛀荚蛾、小红虫等, 隶属于昆虫纲鳞翅目小卷蛾

科,是我国大豆生产上最重要的蛀荚害虫(史树森等,2014)。该虫属专性滞育昆虫,在全国各分布区每年均发生1代,食性单一,主要为害大豆,也取食野生大豆及苦参(徐庆丰等,1965),老熟幼虫以豆田、晒场以及附近土为场所作茧越冬。韩国、朝鲜、日本及俄罗斯等国曾报道过该虫害,在我国东北、华北、西北、西南和华东等地均有分布,其中以东北春大豆区受害最重(史树森等,2014)。其幼虫蛀入豆荚取食籽粒,虫食粒率重者达50%以上,可使大豆减产20%~30%,严重影响大豆的产量和品质(庞春杰等,2012)。

目前,关于大豆食心虫的研究主要集中在以下几个方面:生物学特性(Sakagami et al., 1985; 史树森等,2014)、形态学(杨啸等,2012)、生理生化(胡代花等,2012; 李冬梅等,2012; 王宇,2012)、性信息素(Hu et al., 2013)及防治技术(宋鹏翔等,2014; Song et al., 2015; 赵云彤等,2015)。但迄今有关大豆食心虫地理种群的遗传结构及分化方面报道较少,如朱诗禹等(2017)采用 *COII* 基因对全国不同地理种群大豆食心虫的遗传分化情况进行了初步分析;王红(2015)采用 *COI*、*COII* 和 *Cytb* 基因对中国东北春大豆区大豆食心虫地理种群进行了遗传多样性及基因流分析,但因其取样范围所限,研究结果仅反映我国东北春大豆区大豆食心虫地理种群的遗传分化情况。线粒体 *COI* 基因具有较快的进化速率和清晰的进化模式,有助于研究物种分化和遗传多样性,被广泛应用于农林害虫研究,如甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (王兴亚和许国庆,2014)、大豆食心虫(王红,2015; 朱诗禹等,2017)、烟粉虱 *Bemisia tabaci* (郑宇等,2016)和沙葱萤叶甲 *Galeruca daurica* (张鹏飞等,2017)。

本试验选用线粒体 *COI* 基因作为分子标记,对全国不同大豆产区10省(区)共19个市县地理种群的大豆食心虫种群遗传结构和变异进行研究,分析其不同地理种群的遗传分化程度和遗传多样性,以期进一步为全面探讨中国大豆食心虫不同地理种群间的系统发育及进化关系提供遗传学证据,为指导虫情监测和综合防治策略的制定等提供分子生物学的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试虫源:大豆食心虫老熟幼虫于2013年10月至2015年10月在黑龙江省绥化市(SH)、佳木斯市

(JMS)、黑河市(HH),内蒙古自治区赤峰市(CF)、扎兰屯市(ZLT),吉林省和龙市(HL)、长春市(CC)、安图县(AT),辽宁省普兰店区(PLD)、沈阳市(SY)、本溪市(BX)、铁岭市(TL),河北省沧州市(CZ),陕西省延安市(YA),安徽省宿州市(SZ),江苏省徐州市(XZ),广西壮族自治区都安县(DA)以及贵州省贵阳市(GY)、大方县(DF)等10个省(区)19个市县采集,种群代码为采集样本所在市县名的拼音缩写,每个种群的样本数为8~14头,共214头个体。将采集到的新鲜样品浸泡于无水乙醇中,-70℃超低温冰箱中保存,备用。

试剂及仪器:RNase A酶、蛋白酶K、DL2000 DNA Marker、6×Loading Buffer、50×TAE、琼脂糖N、Taq PCR Master Mix 扩增试剂盒、Ezup柱式动物基因组DNA抽提试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司。DYY-6C型电泳仪,北京市六一仪器厂;MG48型基因扩增仪,杭州朗基科学仪器有限公司;GelDoc-It型凝胶成像系统,Ultra Violet Products Ltd。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 目的片段PCR扩增物的获取和测定

将大豆食心虫单头老熟幼虫经双蒸水漂洗、吸水纸吸干、液氮研磨成粉末后采用Ezup柱式动物基因组DNA抽提试剂盒提取虫体基因组DNA。提取的DNA样品经0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测DNA,合格后保存于-20℃冰箱中备用。

目的片段PCR扩增的上、下游引物参照Simon et al. (1994),上游引物C1-J-1751:GGATCACCTGATATAGCATTC,下游引物C1-N-2191:CCCGGTAAAATTTAAATATAAACTTC。50 μL PCR反应体系:灭菌ddH<sub>2</sub>O 18 μL、模板DNA 2 μL、Taq PCR Master Mix 25 μL、10 μmol/L引物各2 μL、25 mmol/L Mg<sup>2+</sup> 1 μL。扩增反应条件:94℃预变性2 min;94℃变性30 s,48℃退火30 s,72℃延伸1 min,35个循环;最后72℃延伸10 min。5 μL PCR产物于0.8%琼脂糖凝胶进行电泳检测,利用凝胶成像分析系统观察并拍照,确定扩增成功的委托华大基因(中国深圳)科技有限公司进行测序。

#### 1.2.2 碱基组成分析

测序结果采用Chromas软件读取、观察峰值,通过序列整理去除 *COI* 基因两端侧翼序列,将处理后的序列在NCBI网站上进行BLAST比对确认。应用MEGA 6.0(Tamura et al., 2013)进行DNA序列比对及同源性分析,计算所得序列的碱基组成、保守位点、变异位点、简约信息位点、自裔位点、转换碱基

对、颠换碱基对数。

### 1.2.3 单倍型组成与系统发育分析

采用不加权配对算法分别构建以苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* (GenBank 登录号: JQ027365.1) 为外群的单倍型以及由不同地理种群间遗传距离矩阵构建不同地理种群间的系统发育树。进化树分支的置信度采用自展法重复检测 1 000 次。由 Network 5.0 软件 (Polzin & Daneschm, 2003) 绘制单倍型网络图, 用以清晰地说明各单倍型之间的演化关系。

### 1.2.4 遗传多样性及中性检验分析

采用 DnaSP 5.0 软件 (Librado & Rozas, 2009) 对 19 个地理种群内 *COI* 基因序列单倍型数目、单倍型在各地理种群中的分布情况、供试大豆食心虫整体样本和各地理种群样本的单倍型多样性  $H_d$ 、核苷酸多样性  $P_i$ 、核苷酸平均差异数  $K$  等反映种群内及种群间分子变异程度的遗传学参数进行分析, 并进行 Tajima's D 中性检验, Tajima's D 统计值为正值时说明序列进化方式为平衡选择, 且有一些单倍型分化; 负值时为负向选择, 种群的扩张存在瓶颈效应 (周宁宁等, 2014)。

### 1.2.5 遗传分化及变异分析

种群间遗传分化程度参数  $F_{st}$  和  $G_{st}$ 、基因流  $N_m$  等参数采用 DnaSP 5.0 软件分析获得。 $N_m < 1$ , 遗传漂变成为种群间遗传分化的主要因素;  $N_m > 1$ , 表明群体间基因流的水平较高, 群体间遗传分化较小。 $F_{st} < 0.25$ , 表明种群之间基因交流频繁, 总种群没有较大的遗传分化现象;  $F_{st} > 0.25$ , 则说明该种群发生了明显遗传分化。应用 Arlequin 3.5.1.2 软件 (Excoffier et al., 2005) 进行 AMOVA 分子变异分析, 进而对大豆食心虫不同地理种群的遗传分化情况进行评估。根据经纬度计算各采集地之间的地理距离, 利用 GenAlEx 6.41 软件中 Mantel 检验 (Peakall & Smouse, 2006) 检验各地理种群间遗传距离与地理距离的相关性。

## 2 结果与分析

### 2.1 碱基组成分析结果

以 19 个地理种群的 214 头个体的 DNA 为模板进行线粒体 *COI* 基因片段的 PCR 扩增, 共得到 214 条大豆食心虫 *COI* 序列。经比对剪切后, 最终获得长度为 408 bp 的序列片段, 所有序列均没有碱基缺失和插入, 其中保守位点 362 个, 占所测序列长度的 88.73%; 变异位点 46 个, 占所测序列长度的 11.27%; 简约信息位点 23 个, 自裔位点 23 个。发生转换的位

点数 43 个, 转换以 CT 为主; 发生颠换的位点数 3 个, 另有 1 个 A/G/T 三碱基变异位点和 1 个 A/C/T 三碱基变异位点。所测序列的 *COI* 基因片段中, A、G、C、T 的平均含量分别为 28.90%、15.00%、19.10%、37.00%, A+T 平均含量明显高于 C+G 含量。

### 2.2 单倍型组成与系统发育分析结果

本试验共获得 49 种 *COI* 单倍型, 分别命名为 H1~H49 (GenBank 登录号: KU601413~KU601438, KX230797~KX230819)。单倍型 H1 为共享单倍型, 出现在除都安和宿州以外其它的 17 个地理种群中, 出现频率最高, 占有检测个体的 39.72%; 其次出现频率较高的单倍型为 H8、H21, 分别占有检测个体的 5.61%; 有 33 个单倍型仅出现 1 次, 属稀有单倍型。大豆食心虫各地理种群的单倍型数在 1~8 之间, 最少为都安和宿州种群, 最多为沧州、长春、铁岭及延安种群。单倍型 H2、H3 及 H5 与其它单倍型分支明显, 与其它单倍型遗传距离相对较远 (图 1)。

单倍型系统发育树和不同地理种群系统发育树均形成 A、B 和 C 三个明显的支系。19 个地理种群系统发育树中, 贵阳和都安种群单独形成分支 B 和 C, 其它地理种群聚为分支 A (图 2-a)。单倍型系统发育树中, H5 为都安种群所特有, 形成分支 C; H2 和 H3 为贵阳种群所特有, 且系统发育进化树中显示 H2 和 H3 关系较近, 故将 H2 和 H3 定义为分支 B; 其它单倍型聚为分支 A, 分支 A 内遗传距离相差不大, 有些分支间的置信度较低, 说明这些单倍型差异较小, 不能形成可靠分支 (图 2-b)。

单倍型中介网络图、单倍型系统发育树及不同地理种群系统发育树均反映大豆食心虫地理种群间产生了明显的遗传分化, 形成具有较大遗传差异的地理种群。

### 2.3 遗传多样性及中性检验分析结果

供试大豆食心虫 19 个地理种群样本的整体单倍型多样性  $H_d$  为 0.8277, 核苷酸多样性  $P_i$  为 0.0089, 核苷酸平均差异数  $K$  为 3.6220 (表 1)。大豆食心虫各地理种群单倍型多样性  $H_d$  在 0~0.9455 之间, 最低为都安和宿州种群, 最高为长春种群; 核苷酸多样性  $P_i$  在 0~0.0118 之间, 核苷酸平均差异数  $K$  在 0~4.8205 之间, 二者最低均为都安和宿州种群, 最高均为贵阳种群。Tajima's D 和中性显著性检测结果显示, 除安图种群外其它种群均无显著性差异, 总群体的 Tajima's D 为 -1.5946, 结果不显著 ( $0.05 < P < 0.10$ ), 表明大豆食心虫总体上在较近时间内未经历明显的种群扩张。

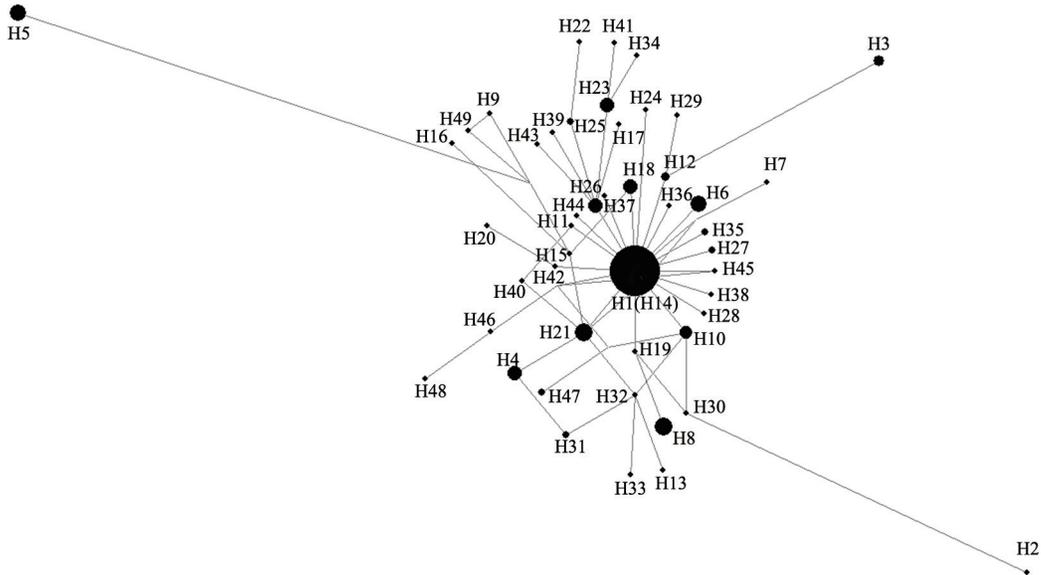


图1 大豆食心虫线粒体 *COI* 基因各单倍型中介网络图

Fig.1 Network of haplotypes based on mitochondrial *COI* gene of *Leguminivora glycinivorella*

H1~H49: *COI* 基因单倍型。圆面积代表单倍型出现频率。H1~H49: Mitochondrial *COI* gene. Circle areas are proportional to haplotype frequencies.

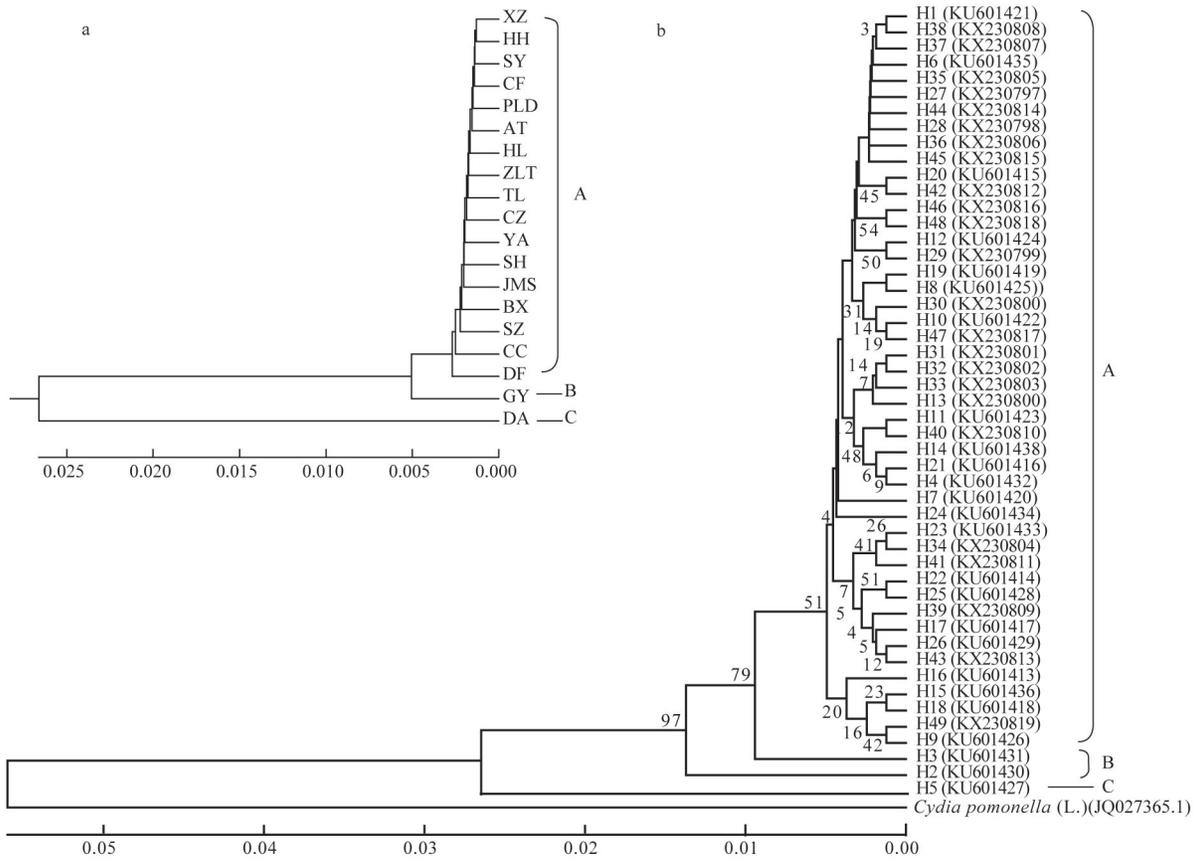


图2 基于不加权配对算法构建大豆食心虫线粒体 *COI* 基因 19 个地理种群(a)和 49 种单倍型(b)系统发育树

Fig. 2 Molecular phylogenetic trees of 19 geographic populations (a) and 49 haplotypes (b) of mitochondrial *COI* gene of *Leguminivora glycinivorella* using UPGMA method

H1~H49: *COI* 基因单倍型。H1~H49: Mitochondrial *COI* gene. XZ, HH, SY, CF, PLD, AT, HL, ZLT, TL, CZ, YA, SH, JMS, BX, SZ, CC, DF, GY, DA: Xuzhou, Heihe, Shenyang, Chifeng, Pulandian, Antu, Helong, Zhalantun, Tieling, Cangzhou, Yan'an, Suihua, Jiamusi, Benxi, Suzhou, Changchun, Dafang, Guiyang, Du'an population.

表1 大豆食心虫不同地理种群 *COI* 基因单倍型多样性、核苷酸多样性分析及 Tajima's D 中性检验Table1 Haplotype diversity, nucleotide diversity of *COI* gene and Tajima's D test in different geographic populations of *Leguminivora glycinivorella*

种群代码 Population code	单倍型编码 Haplotype code	单倍型多样性 Haplotype diversity	核苷酸多样性 Nucleotide diversity	核苷酸平均差异数 Average number of nucleotide differences	中性检测 Tajima's D	中性检验显著性 Statistical significance
DA	H5(10)	0.0000	0.0000	0.0000	-	-
GY	H1(3), H2(1), H3(4), H4(5)	0.7564	0.0118	4.8205	-0.5070	$P>0.10$
SZ	H6(10)	0.0000	0.0000	0.0000	-	-
YA	H1(5), H8(1), H10(1), H13(1), H14(1), H15(1), H18(1), H21(1)	0.8485	0.0043	1.7576	-0.9461	$P>0.10$
CZ	H1(5), H8(1), H9(1), H10(1), H11(1), H12(1), H18(1), H21(1)	0.8485	0.0043	1.7727	-1.6446	$0.05<P<0.10$
CF	H1(8), H7(1), H8(1), H21(2), H25(1), H26(1)	0.6813	0.0031	1.2418	-1.6083	$0.05<P<0.10$
PLD	H1(5), H8(1), H18(1), H12(2), H25(1)	0.7556	0.0033	1.3556	-1.4929	$P>0.10$
CC	H1(4), H16(1), H17(1), H18(1), H19(1), H20(1), H21(1), H22(1)	0.9455	0.0062	2.5091	-1.1285	$P>0.10$
HH	H1(6), H23(2), H24(1)	0.5556	0.0030	1.2222	-0.6891	$P>0.10$
AT	H1(5), H21(1), H26(1), H28(1), H29(1), H30(1)	0.7778	0.0034	1.4000	-1.8319	$P<0.05$
DF	H1(3), H4(2), H8(1), H31(2)	0.8214	0.0051	2.0714	0.3364	$P>0.10$
JMS	H1(5), H21(1), H23(1), H26(2), H32(1), H33(1), H34(1)	0.8333	0.0043	1.7727	0.2606	$P>0.10$
BX	H1(3), H8(4), H18(1), H26(2), H27(1), H35(1)	0.8485	0.0043	1.7727	-0.4110	$P>0.10$
SY	H1(7), H8(2), H10(2), H21(1), H36(1)	0.7053	0.0028	1.1539	-1.0121	$P>0.10$
SH	H1(5), H23(1), H37(1), H38(1), H39(1), H40(1), H41(1)	0.8182	0.0046	1.8546	-1.3282	$P>0.10$
TL	H1(5), H18(2), H21(1), H23(2), H27(1), H35(1), H42(1), H43(1)	0.8681	0.0039	1.6044	-1.3659	$P>0.10$
XZ	H1(9), H8(1), H10(1), H18(1), H44(1), H45(1)	0.6813	0.0024	0.9780	-1.7289	$P>0.10$
ZLT	H1(3), H21(2), H23(1), H26(1), H46(1), H47(1)	0.8889	0.0041	1.6667	-1.0691	$P>0.10$
HL	H1(6), H21(1), H47(1), H48(1), H49(1)	0.6667	0.0038	1.5556	-1.5729	$0.05<P<0.10$
总种群 Total population		0.8277	0.0089	3.6220	-1.5946	$0.05<P<0.10$

括号内数据为该地理种群样本中符合所定义单倍型的样本数。The data in parentheses indicate that the geographical population samples are in accordance with defined haploid type sample.

#### 2.4 遗传分化及变异分析结果

DnaSP 5.0 计算结果表明, *COI* 基因大豆食心虫总群体固定系数  $F_{st}$  为 0.59, 分化系数  $G_{st}$  为 0.14, 基因流  $N_m$  为 0.17, 分化程度显著。大豆食心虫各地理种群之间的遗传分化系数  $F_{st}$  值在 -0.06~1.00 之间, 遗传分化系数  $G_{st}$  在 -0.03~1.00 之间, 核苷酸差异数  $K_{xy}$  在 1.0556~22.0000 之间, 核苷酸歧义度  $D_{xy}$  在

0.0029~0.0517 之间。贵阳和都安种群与其它地理种群间  $F_{st}$ 、 $G_{st}$ 、 $K_{xy}$ 、 $D_{xy}$  值均明显大于其它 17 个地理种群间各值, 说明这 2 个地理种群与其它地理种群在 *COI* 基因水平上表现较高的遗传差异。其中, 都安种群与其它地理种群间的  $F_{st}$  值达到 0.94 以上; 贵阳种群与其它地理种群间的  $F_{st}$  值除与大方种群仅为 0.08 外, 其余均达到 0.19 以上(表 2)。

表2 大豆食心虫不同地理种群间遗传分化系数 $G_{st}$ 与固定系数 $F_{st}$   
 Table 2 The genetic differentiation coefficient  $G_{st}$  and the fixation coefficient  $F_{st}$  values among different geographic populations of *Leguminivora glycinivorella*

地理种群 Geographic population	安图 Antu	长春 Chang- chun	和龙 Helong	普兰店 Pulandian	本溪 Benxi	沈阳 Shenyang	铁岭 Tieling	绥化 Suihua	佳木斯 Jiamusi	黑河 Heihe	赤峰 Chifeng	扎兰屯 Zhalantun	大方 Dafang	贵阳 Guiyang	宿州 Suzhou	延安 Yan'an	沧州 Cangzhou	徐州 Xuzhou	都安 Du'an
安图Antu		-0.01	-0.02	-0.01	0.03	-0.01	0.00	-0.02	-0.02	0.00	-0.02	-0.02	0.01	0.07	0.44	-0.02	-0.02	-0.01	0.44
长春Changchun	0.00		0.01	0.00	0.01	-0.01	0.00	-0.02	-0.01	0.04	0.01	-0.02	0.01	0.05	0.35	-0.01	-0.01	0.01	0.35
和龙Helong	-0.04	-0.02		-0.01	0.06	-0.01	0.01	-0.01	-0.01	-0.01	-0.02	-0.01	0.02	0.09	0.50	-0.01	-0.01	-0.01	0.50
普兰店Pulandian	-0.04	0.00	-0.01		0.02	-0.01	0.00	-0.01	0.00	0.01	-0.01	0.01	0.01	0.08	0.45	-0.02	-0.03	-0.02	0.45
本溪Benxi	0.06	0.06	0.06	0.02		0.02	0.02	0.03	0.02	0.08	0.04	0.02	0.02	0.08	0.38	0.01	0.01	0.04	0.38
沈阳Shenyang	-0.03	0.05	-0.02	0.00	0.02		0.00	0.00	0.00	0.01	-0.02	0.01	0.01	0.09	0.44	-0.02	-0.02	-0.02	0.44
铁岭Tieling	-0.01	-0.04	-0.02	0.00	0.08	0.04		-0.01	-0.01	0.01	0.01	-0.01	0.02	0.06	0.35	-0.02	-0.02	0.00	0.35
绥化Suihua	0.00	0.00	-0.01	0.01	0.06	0.04	-0.03		-0.01	-0.01	-0.01	-0.01	0.01	0.06	0.41	-0.01	-0.01	-0.01	0.41
佳木斯Jiamusi	0.02	0.02	0.01	0.09	0.13	0.08	-0.01	-0.01		0.01	-0.01	-0.03	0.01	0.06	0.39	-0.01	-0.01	0.00	0.39
黑河Heihe	0.01	0.02	0.03	0.03	0.11	0.08	-0.04	-0.05	0.02		0.00	0.02	0.04	0.12	0.58	0.01	0.01	0.00	0.58
赤峰Chifeng	-0.04	-0.01	-0.04	-0.02	0.05	0.00	0.00	-0.01	0.03	0.01		-0.01	0.02	0.09	0.45	-0.01	-0.01	-0.01	0.45
扎兰屯Zhalantun	-0.04	-0.02	-0.08	0.01	0.06	-0.01	-0.04	-0.06	-0.06	-0.03	-0.05		0.01	0.06	0.40	-0.01	-0.01	0.02	0.40
大方Dafang	0.14	0.14	0.10	0.20	0.20	0.14	0.18	0.18	0.13	0.25	0.16	0.10		0.02	0.44	0.00	0.00	0.02	0.44
贵阳Guiyang	0.20	0.20	0.19	0.21	0.25	0.23	0.22	0.22	0.21	0.25	0.22	0.19	0.08		0.42	0.06	0.06	0.09	0.42
宿州Suzhou	0.59	0.47	0.57	0.60	0.57	0.64	0.57	0.54	0.57	0.68	0.62	0.56	0.59	0.45		0.38	0.38	0.45	1.00
延安Yan'an	0.00	0.02	-0.05	0.05	0.09	0.00	0.03	0.06	0.04	0.11	0.01	-0.02	0.06	0.19	0.56		-0.03	-0.02	0.38
沧州Cangzhou	-0.05	-0.02	-0.06	-0.04	0.03	-0.02	-0.02	0.00	0.03	0.03	-0.03	-0.04	0.11	0.19	0.54	-0.04		-0.02	0.38
徐州Xuzhou	-0.02	0.03	-0.02	-0.02	0.06	-0.02	0.01	0.05	0.11	0.06	0.01	0.03	0.21	0.25	0.67	0.03	-0.04		0.45
都安Du'an	0.97	0.94	0.96	0.97	0.96	0.97	0.96	0.95	0.96	0.98	0.97	0.96	0.95	0.88	1.00	0.96	0.96	0.98	

上三角为遗传分化系数 $G_{st}$ , 下三角为固定系数 $F_{st}$ 。  $G_{st}$  is above the diagonal and  $F_{st}$  is below the diagonal.

AMOVA 分析显示,组间变异占方差比率的 84.12%,组内种群间变异占方差比率的 1.29%,种群内变异占方差比率的 14.59%,表明遗传变异主要来自组间(表3)。各地理种群间遗传距离与地理距离

的 Mantel 相关性分析表明(图3),大豆食心虫种群间的地理距离与遗传分化程度存在显著正相关( $r=0.325$ ,  $P=0.01<0.05$ ),表明地理距离是影响大豆食心虫不同地理种群间遗传距离和基因交流的重要因素。

表3 大豆食心虫 19个地理种群组间线粒体 *COI* 基因的分子变异分析

Table 3 Analysis of molecular variance (AMOVA) of mitochondrial *COI* gene of *Leguminivora glycinivorella* among groups of 19 geographic populations

变异来源 Source of variation	自由度 <i>df</i>	平方和 Sum of square	方差组分 Variance component	方差比率 (%) Percentage of variation
组间 Among groups	2	201.1730	4.6817 Va	84.12
组内种群间 Within groups	16	25.8510	0.0717 Vb	1.29
种群内 Within population	195	158.3130	0.8119 Vc	14.59

Va、Vb、Vc 表示方差组分的数量。Va, Vb, Vc are the number of variance components, respectively.

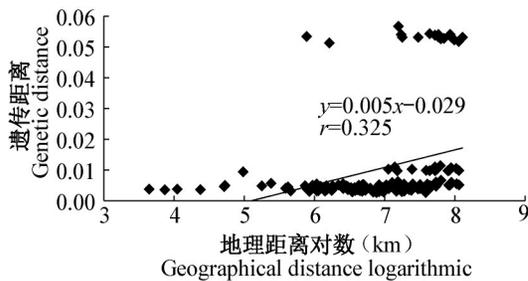


图3 大豆食心虫 19个地理种群的遗传距离与地理距离自然对数的 Mantel 检验

Fig. 3 Mantel test between genetic distance and the natural logarithm of geographic distance among 19 geographic populations of *Leguminivora glycinivorella*

### 3 讨论

通过分析 408 bp 的 *COI* 基因片段,发现 A+T 含量 (65.9%) 明显高于 C+G 含量 (34.1%),表现出明显的碱基 A/T 偏向性,符合昆虫线粒体基因序列碱基组成特点 (Liu & Beckenbah, 1992); 序列变异中转换 (43 个位点) 多于颠换 (3 个位点),符合亲缘关系较近的分类阶元中核苷酸替换的转换多于颠换的研究结果 (Simon et al., 1994)。在 19 个地理种群中共获得 49 种单倍型,单倍型 H1、H8、H18、H21 至少被 6 个种群共享,为共享单倍型;单倍型 H2、H3 等为某个地理种群所特有,共享单倍型和独享单倍型的出现表明各地理种群在存在基因交流的同时,也具有一定程度上的遗传分化 (孙崑等, 2013; 朱诗禹等, 2017)。在本试验中,贵阳等地理种群均出现同 1 个地理种群中存在不同单倍型的情况,此研究结果与刘晓娜等 (2016) 研究江苏地区 Q 型烟粉虱 *Bemisia tabaci* biotype Q 的单倍型时结果一致,分析其原因可能是由于 Q 型烟粉虱受多种环境因素影响而发生

的遗传变化。

郑宇等 (2016) 研究表明,福建省烟粉虱总群体单倍型多样性为 0.838,遗传多样性水平较高,本研究结果中大豆食心虫总群体单倍型多样性为 0.8277,其遗传多样性水平与上述研究结果相近,表明大豆食心虫种群也具有较高的单倍型多态性,整体遗传多样性相对较高。李春选等 (2003) 研究表明,中华稻蝗 *Oxya chinensis*、长翅素木蝗 *Shirakiacris shirakii*、笨蝗 *Haplotropis brunneriana* 及短额负蝗 *Atractomorpha sinensis* 因遗传背景、生物学特性以及生态环境条件不同,体现出不同的遗传多样性水平;李冉等 (2015) 发现,哈尔滨、合肥、牡丹江及赣州 4 个大豆蚜地理种群的遗传多样性比其它 10 个地理种群相对高,认为自然生态环境、自然选择及寄主植物的选择作用影响不同地理种群的遗传结构;本试验大豆食心虫各地理种群单倍型多样性与核苷酸多样性存在一定差异,推测原因可能是大豆食心虫分布较广泛,飞行能力较弱,各地理种群可能会因其生态环境条件不同体现不同的遗传多样性水平,与李春选等 (2003) 和李冉 (2015) 等研究结果一致。本研究结果 Tajima's D 值为 -1.5946 且检验结果不显著,表明在较近历史时期内大豆食心虫总体未经历群体扩张,种群大小保持相对稳定的状态,与 Harpending et al. (1998)、王兴亚和许国庆 (2014) 的研究结果一致。

王红 (2015) 研究表明,中国东北地理种群大豆食心虫总群体的  $F_{st}$  为 0.12545,  $N_m$  为 3.49,认为中国东北大豆食心虫地理种群遗传分化程度较小,基因交流未受地理距离影响。而本研究结果表明,大豆食心虫总群体  $F_{st}$  为 0.59,大豆食心虫不同地理种群间存在很大程度的遗传分化;总群体  $N_m$  为 0.17,表

明各地理种群间基因流水平很低,可能由于遗传漂变发生了分化(张利娟等, 2012)。Pashley(1986)认为,地理环境和寄主植物是影响异域分布的植食性昆虫产生种下分化的主要原因。朱诗禹等(2017)采用线粒体 *COII* 基因研究中国大豆食心虫不同地理种群遗传分化时发现,当不同地理种群间地理距离产生明显环境异质性时,可导致遗传分化;本试验结果表明,都安和贵阳种群与其它地理种群间基因流受地理距离影响,与其它地理种群间分化明显,与朱诗禹(2017)等试验结果一致。由此可见,地理距离是影响不同地理种群间遗传距离的重要因素;Tree & Walter(2009)研究表明,不同品种寄主对母管蓟马属蓟马的行为特性和生活史具有一定影响;在本试验中贵阳市和都安县地处南方多作大豆区,大豆栽培品种和耕作制度多样,与其它种群所处地区的大豆种植品种、耕作制度均存在显著差异,因此,野生大豆分布及栽培大豆区域范围等寄主条件是大豆食心虫发生分布的限制因素,影响大豆食心虫不同地理种群间的遗传分化(朱诗禹等, 2017)。

在本试验中,宿州种群与其它地理种群间固定系数较大,但宿州种群在中介网络图、单倍型系统进化树及以不同地理种群间遗传距离构建系统发育树中均未体现出明显遗传分化,究其原因可能是宿州种群的采样范围小且数量较少,单倍型多样性为0,没有更好地反应出宿州种群与其它地理种群间的遗传分化情况。在下一步研究中,需增加试验采样地及样本数量,并结合多种分子标记方法更全面了解大豆食心虫的遗传结构和遗传多样性。

### 参 考 文 献 (References)

- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolution Bioinformatics Online*, 1: 47-50
- Harpending HC, Batzer MA, Gurven M, Jorde LB, Rogers AR, Sherry ST. 1998. Genetic traces of ancient demography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 1961-1967
- Hu D, Feng J, Wang Z, Wu H, Zhang X. 2013. Effect of nine plant volatiles in the field on the sex pheromones of *Leguminivora glycinivorella*. *Natural Product Communications*, 8(3): 393-396
- Hu DH, Cai CL, Zhang J, Feng JT, Zhang X. 2012. Convenient synthesis and field evaluation of the sex pheromone of *Leguminivora glycinivorella* and its analogues. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 14(2): 125-130 (in Chinese) [胡代花, 蔡崇林, 张璟, 冯俊涛, 张兴. 2012. 大豆食心虫性信息素及其类似物的简易合成及田间引诱活性. *农药学报*, 14(2): 125-130]
- Li CX, Ma EB, Zheng XY. 2003. Genetic differentiation of different populations of four locust species in China. *Acta Genetica Sinica*, 30(3): 234-244 (in Chinese) [李春选, 马恩波, 郑先云. 2003. 中国4种蝗虫不同种群的遗传分化. *遗传学报*, 30(3): 234-244]
- Li DM, Meng FL, Wang ZK, Zang ZY, Sun J, Li WB. 2012. Cloning and characterization of 28S *rDNA* gene from soybean pod borer (*Leguminivora glycinivorella* Matsumura). *Journal of Northeast Agricultural University*, 43(7): 13-17 (in Chinese) [李冬梅, 孟凡立, 王志坤, 臧振源, 孙晶, 李文滨. 2012. 大豆食心虫 28S *rDNA* 基因的克隆及表达分析. *东北农业大学学报*, 43(7): 13-17]
- Li R, Han LL, Wang H, Zhao KJ, Mang YL, Zhang HY, Fan D. 2015. Analysis of genetic differentiation among different geographic populations of *Aphis glycines* (Hemiptera: Aphididae) based on mtDNA *CO II* gene sequences. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 52(5): 1203-1214 (in Chinese) [李冉, 韩岚岚, 王红, 赵奎军, 莽逸伦, 张红玉, 樊东. 2015. 基于线粒体 *COII* 基因的大豆蚜不同地理种群遗传分化研究. *应用昆虫学报*, 52(5): 1203-1214]
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(1): 1451-1452
- Liu H, Beckenbach AT. 1992. Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase *II* gene among 10 orders of insects. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1(1): 41-52
- Liu XN, Xu LL, Cai L, Du YM, Du YZ. 2016. Haplotype analysis of *Bemisia tabaci* biotype Q in Jiangsu Province, China. *Journal of Plant Protection*, 43(1): 70-77 (in Chinese) [刘晓娜, 许丽丽, 蔡力, 杜以梅, 杜予州. 2016. 江苏地区 Q 型烟粉虱的单倍型分析. *植物保护学报*, 43(1): 70-77]
- Pang CJ, Han LL, Yang S, Zhao KJ, Wang L. 2012. Biological control of *Leguminivora glycinivorella*. *Soybean Science & Technology*, (2): 31-35 (in Chinese) [庞春杰, 韩岚岚, 杨帅, 赵奎军, 王玲. 2012. 大豆食心虫生物防治研究进展. *大豆科技*, (2): 31-35]
- Pashley DP. 1986. Host associated genetic differentiation in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae): a sibling species complex. *Annals of the Entomological Society of America*, 79(6): 98-904
- Peakall R, Smouse PE. 2006. GenALEX version 5.0: genetic analysis in Excel. *Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes*, 6(1): 288-295
- Polzin T, Daneschm SV. 2003. On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Operations Research Letters*, 31(1): 12-20
- Sakagami SF, Tanno K, Tsutsui H, Honma K. 1985. The role of cocoons in overwintering of the soybean pod borer *Leguminivora glycinivorella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 58(2): 240-247
- Shi SS, Cui J, Xu W, Wu TT, Qi LZ, Li WY, Song PX, Zhang M. 2014. Effects of temperature on growth of *Leguminivora glycinivorella* eggs and larva. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 36(2): 250-255 (in Chinese) [史树森, 崔娟, 徐伟, 武婷婷, 齐灵子, 李维宇, 宋鹏翔, 张萌. 2014. 温度对大豆食心虫卵和幼虫生长发

- 育的影响. 中国油料作物学报, 36(2): 250-255]
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequence and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87(6): 651-701
- Song LW, Wen XY, Zang LS, Ruan CC, Shi SS, Shao XW, Zhang F. 2015. Parasitism and suitability of different egg ages of the *Leguminivora glycinivorella* (Lepidoptera: Tortricidae) for three indigenous *Trichogramma* species. *Journal of Economic Entomology*, 108(3): 933-939
- Song PX, Cui J, Li WY, Wu TT, Zhang M, Qin HD, Shi SS. 2014. Control efficacy of 5 pesticides on *Leguminivora glycinivorella*. *Soybean Science & Technology*, (2): 40-42 (in Chinese) [宋鹏翔, 崔娟, 李维宇, 武婷婷, 张萌, 秦昊东, 史树森. 2014. 5种杀虫剂对大豆食心虫防治效果. 大豆科技, (2): 40-42]
- Sun W, Zhang ZT, Dong H, Qian HT, Shi Y, Xie LN, Cong B. 2013. Analysis of genetic differentiation and gene flow among different geographic populations of *Oedaleus infernalis* (Orthoptera: Acrididae) based on mtDNA *COI* gene sequences. *Acta Entomologica Sinica*, 56(8): 907-916 (in Chinese) [孙崑, 张柱亭, 董辉, 钱海涛, 石玉, 谢丽娜, 丛斌. 2013. 基于线粒体 *COI* 基因序列的黄胫小车蝗不同地理种群的遗传分化及基因流分析. 昆虫学报, 56(8): 907-916]
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiński A, Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725-2729
- Tree DJ, Walter GH. 2009. Diversity of host plant relationships and leaf galling behaviours within a small genus of thrips-*Gynai-kothrips* and *Ficus* in south east Queensland, Australia. *Australian Journal of Entomology*, 48(4): 269-275
- Wang H. 2015. Analysis of the genetic diversity and gene flow in geographic populations of *Leguminivora glycinivorella* (Lepidoptera: Olethreutidae) in northeastern China. Master Thesis. Harbin: Northeast Agricultural University (in Chinese) [王红. 2015. 大豆食心虫中国东北地理种群遗传多样性及基因流分析. 硕士学位论文. 哈尔滨: 东北农业大学]
- Wang XY, Xu GQ. 2014. Analysis of genetic diversity in different geographic populations of the beet armyworm *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) in China. *Acta Entomologica Sinica*, 57(9): 1061-1074 (in Chinese) [王兴亚, 许国庆. 2014. 中国甜菜夜蛾地理种群的遗传分化与基因流. 昆虫学报, 57(9): 1061-1074]
- Wang Y. 2012. Molecular cloning, analysis and expression of olfactory genes of *Heliothis virescens* and *Leguminivora glycinivorella*. Ph. D Thesis. Harbin: Northeast Agricultural University (in Chinese) [王宇. 2012. 苜蓿夜蛾和大豆食心虫气味感受相关蛋白基因的克隆分析及表达. 博士学位论文. 哈尔滨: 东北农业大学]
- Xu QF, Guo SG, Han YM, Feng Z, Zhang R, Li YZ. 1965. A study on the soy bean pod borer (*Leguminivora glycinivorella* (Mats.) Obraztsov). *Acta Entomologica Sinica*, 14(5): 461-475 (in Chinese) [徐庆丰, 郭守桂, 韩玉梅, 冯真, 张荣, 李义忠. 1965. 大豆食心虫 *Leguminivora glycinivorella* (Mats.) Obraztsov 的研究. 昆虫学报, 14(5): 461-475]
- Yang X, Zhao KJ, Wang KQ, Han LL, Yang S. 2012. Observation on antennal sensillia of *Leguminivora glycinivorella* with scanning electron microscope. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(5): 1321-1326 (in Chinese) [杨啸, 赵奎军, 王克勤, 韩岚岚, 杨帅. 2012. 大豆食心虫触角感器的扫描电镜观察. 应用昆虫学报, 49(5): 1321-1326]
- Zhang LJ, Shen DR, Sun YX, Li ZY, Zhang HR. 2012. Analysis of genetic differentiation among geographic populations of *Gynai-kothrips ficorum* (Marchal) (Thysanoptera: Phlaeothripidae) in Yunnan, southwestern China, based on mtDNA *COI* gene sequences. *Acta Entomologica Sinica*, 55(2): 199-207 (in Chinese) [张利娟, 沈登荣, 孙跃先, 李正跃, 张宏瑞. 2012. 基于 mtDNA *COI* 基因序列的云南榕母管蚜不同地理种群的遗传分化分析. 昆虫学报, 55(2): 199-207]
- Zhang PF, Zhou XR, Pang BP, Tan Y, Tian S. 2017. Population genetic diversity and differentiation of *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae) from Inner Mongolia based on mitochondrial DNA *COI* gene sequences. *Journal of Environmental Entomology*, 39(2): 332-341 (in Chinese) [张鹏飞, 周晓榕, 庞保平, 谭瑶, 田帅. 2017. 基于线粒体 *COI* 基因序列的内蒙古沙葱萤叶甲种群遗传多样性及遗传分化. 环境昆虫学报, 39(2): 332-341]
- Zhao YT, Shi XR, Xie GQ. 2015. Research on occurrence dynamic and control technology for *Leguminivora glycinivorella* in Mudanjiang hilly region. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, (1): 57-59 (in Chinese) [赵云彤, 时新瑞, 解国庆. 2015. 牡丹江丘陵区大豆食心虫发生动态及其防治技术的研究. 黑龙江农业科学, (1): 57-59]
- Zheng Y, Yao FL, Huang XY, Ding XL, He YX, Weng QY. 2016. Genetic structure of the geographical populations of tobacco whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius) in Fujian, China. *Journal of Plant Protection*, 43(1): 78-83 (in Chinese) [郑宇, 姚凤銮, 黄晓燕, 丁雪玲, 何玉仙, 翁启勇. 2016. 福建省烟粉虱不同地理种群遗传结构特征. 植物保护学报, 43(1): 78-83]
- Zhou NN, Wang MX, Cui L, Pan C, Zhang XT, Han BY. 2014. Genetic variation of *Empoasca vitis* (Göthe) (Hemiptera: Cicadellidae) among different geographical populations based on mtDNA *COI* complete sequence. *Acta Ecologica Sinica*, 34(23): 6879-6889 (in Chinese) [周宁宁, 王梦馨, 崔林, 潘铖, 张新亭, 韩宝瑜. 2014. 基于 *COI* 基因全长序列的假眼小绿叶蝉地理种群遗传分化研究. 生态学报, 34(23): 6879-6889]
- Zhu SY, Xu W, Gao Y, Cui J, Ou SQ, Shi SS. 2017. Analysis of genetic differentiation of geographic populations of *Leguminivora glycinivorella* (Lepidoptera: Olethreutidae) based on mitochondrial DNA *COII* gene sequences in China. *Acta Entomologica Sinica*, 60(4): 475-486 (in Chinese) [朱诗禹, 徐伟, 高宇, 崔娟, 欧师琪, 史树森. 2017. 基于线粒体 *COII* 基因的中国大豆食心虫不同地理种群遗传分化分析. 昆虫学报, 60(4): 475-486]

(责任编辑:张俊芳)