

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2014.03.010

我国西花蓟马线粒体 DNA-COI 基因 变异及群体遗传结构分析

张桂芬^{1,2*}, 乔玮娜¹, 古君伶³, 闵亮¹, 万方浩^{1,2*}

¹ 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193;

² 农业部外来入侵生物预防与控制研究中心, 北京 100193;

³ 北京市顺义区植保植检站, 北京 101300

摘要:【背景】西花蓟马于 2003 年入侵中国后, 迅速传播扩散并在局部区域造成严重危害, 对我国蔬菜、花卉及果树产业的健康发展构成了巨大威胁。【方法】以线粒体 DNA 标记技术, 对采自我国 13 个省(市)不同地理区域西花蓟马种群的 175 条 COI 基因进行序列变异及群体遗传结构分析。【结果】试验共检测到 13 个单倍型, 各地理种群西花蓟马的单倍型多样性 Hd 较高, 为 0.691, 而核苷酸多样性 π 较低, 为 0.00652。总体固定指数 Fst 为 0.24359, 基因流 Nm 为 0.78; 种群之间固定指数和基因交流分析表明, 我国各地理种群间可能出现了一定分化。种群间 AMOVA 分析显示, 我国西花蓟马的遗传变异主要来自种群内部。对国内外不同地理种群 COI 基因序列的单倍型进行聚类分析表明, 我国西花蓟马有 2 个品系, 即温室品系和羽扇豆品系, 其中羽扇豆品系来源于新西兰和荷兰, 而广泛存在的温室品系存在多个入侵来源。【结论与意义】我国西花蓟马各地理种群的发生, 既与国际贸易活动有关, 又与国内蔬菜、花卉、水果等的调运以及观光旅游密不可分。研究结果对西花蓟马的有效阻截及其种群扩张趋势监测意义重大。

关键词: 西花蓟马; 线粒体 DNA; 基因变异; 遗传结构; 地理种群; 单倍型

Genetic variability of mtDNA COI and population structure of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) in China

Gui-fen ZHANG^{1,2*}, Wei-na QIAO¹, Jun-ling GU³, Liang MIN¹, Fang-hao WAN^{1,2*}

¹ State Key Laboratory for the Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; ² Center for Management of Invasive Alien Species, Ministry of Agriculture, Beijing 100193, China; ³ Plant Protection and Quarantine Station of Shunyi, Beijing 101300, China

Abstract: 【Background】The western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande), spreads rapidly since it invaded China in 2003, and has caused severe damage in some areas. It poses a great threat on the normal development of vegetables, flowers and fruits. 【Method】In the present study, a mitochondrial DNA (mtDNA) marker analysis based on 175 COI gene sequences was used to examine the genetic variability and population structure of *F. occidentalis* of 13 populations collected in different geographic areas of China. 【Result】Thirteen haplotypes were identified. The haplotype diversity ($Hd=0.691$) of different geographic populations of the thrips was much higher than the nucleotide diversity ($\pi=0.0065$). The total genetic fixations index (Fst) was 0.24 and gene flow (Nm) 0.78, respectively. Evaluation of Fst and Nm between geographical populations indicated that genetic differentiation may have occurred. The analysis of molecular variance (AMOVA) between geographical populations of *F. occidentalis* showed that the genetic variation mainly occurred within the same populations. The cluster analysis based on haplotypes of COI gene sequences from domestic and foreign populations indicated that two strains of *F. occidentalis*, the glasshouse strain and the lupin strain, were detected in China. The lupin strain could be from New Zealand and Holland; however, the glasshouse strain should have multiple sources of invasion. 【Conclusion and significance】In China, the western flower thrips was first recorded on pepper plants in a glasshouse in

收稿日期(Received): 2014-05-20 接受日期(Accepted): 2014-06-14

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(201103026); 国家重点基础研究发展规划(“973”计划)项目(2009CB119200); 国家自然科学基金项目(30971967)

作者简介: 张桂芬, 女, 研究员。研究方向: 入侵生物学与分子生态学。E-mail: guifenzhang3@163.com

* 通讯作者(Author for correspondence), 张桂芬, E-mail: guifenzhang3@163.com; 万方浩, E-mail: wanfanghao@caas.cn

Beijing, two years later it was reported in Yunnan. Since then, *F. occidentalis* has rapidly expanded, which not only correlated with the activities of international trade, but also with the domestic transportation of vegetables, flowers and fruits as well as tourism. The present results should be useful in reduce further invasion of *F. occidentalis* and monitoring its spread through China.

Key words: *Frankliniella occidentalis*; mtDNA; genetic variability; genetic structure; geographical population; haplotype

西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* (Pergande), 又称苜蓿蓟马 alfalfa thrips, 属蓟马科 Thripidae 花蓟马属 *Frankliniella*, 原产于加拿大西部和美国北部, 最早记载于 1895 年, 是美国加利福尼亚州的常见害虫 (Beshear, 1983)。随着加州花卉产业的发展, 西花蓟马随花卉及其产品的销售, 扩散蔓延至宾夕法尼亚州 (1966 年)、堪萨斯州 (1971 年)、北卡罗来纳州 (1977 年)、路易斯安那州 (1983 年) 等地 (任洁, 2006)。迄今, 西花蓟马已遍布美国 50 个州 (Rugman-Jones *et al.*, 2010)。同时, 随着国际贸易往来的日趋频繁, 该虫随花卉和蔬菜的远距离运输迅速向世界各地扩散。1983 年, 西花蓟马首次在荷兰温室的非洲堇 *Saintpaulia ionantha* Wendl 上被发现, 而后迅速在欧洲南部地区建立种群 (Brods-gaard, 1993; Kirk & Terry 2003; Vierbergen, 1999)。之后, 该蓟马又先后在以色列 (1987 年) (Argaman *et al.*, 1989)、南非 (1987 年) (Giliomee, 1989)、马来西亚 (1989 年) (Fauziah & Saharan, 1991)、日本 (1990 年) (Hayase & Fukuda, 1991)、澳大利亚 (1993 年) (Malipatil *et al.*, 1993)、韩国 (1994 年) (Chung *et al.*, 2000) 等国发现, 并在局部地区造成严重危害。目前, 西花蓟马已成为世界范围内严重制约蔬菜、花卉、果树等产业发展的重要害虫之一 (Gerin *et al.*, 1994; Kirk & Terry, 2003)。

早在 1997 年, 我国就将西花蓟马列入《中华人民共和国进境植物检疫潜在危险性病、虫、杂草名录 (试行)》[动植检植字 (1997) 33 号]。我国于 2003 年 7 月在北京郊区的温室辣椒上发现西花蓟马 (张友军等, 2003), 之后又在云南 (2005 年) (徐家菊等, 2005)、贵州 (2006 年) (袁成明等, 2008)、山东 (2007 年) (郑长英等, 2007)、黑龙江 (2007 年) (武晓云等, 2009)、湖南 (2008 年) (刘佳等, 2010)、南京 (2008 年) (严丹侃等, 2010)、新疆 (2010 年) (杨华等, 2010)、西藏 (2012) (王海鸿等, 2013) 等地相继有西花蓟马发生的报道。

以往的研究显示, 西花蓟马有 2 个品系, 即温室品系 (glasshouse strain) 和羽扇豆品系 (lupin strain) (Brunner & Frey, 2010; Rugman-Jones *et al.*,

2010)。其中, 温室品系源于美国加利福尼亚州, 20 世纪 80 年代, 西花蓟马从美国传入荷兰温室蔬菜和花卉集散地后, 迅速向整个欧洲和非洲南部蔓延, 在当地形成抗药性较强的温室品系 (Kirk & Terry, 2003)。羽扇豆品系源于新西兰, 早在 19 世纪 30 年代从美国加利福尼亚州随羽扇豆传入新西兰 (Kirk & Terry, 2003; Martin & Workman, 1994), 只危害羽扇豆类植物, 对其他作物没有危害 (Martin & Workman, 1994); 20 世纪 90 年代, 羽扇豆品系传至整个美国北部和加拿大南部 (Kirk & Terry 2003; Rugman-Jones *et al.*, 2010)。有研究显示, 西花蓟马的 2 个品系在体色、抗寒性、抗药性等方面均有很大区别 (Felland *et al.*, 1993; Kirk & Terry, 2003; Martin & Workman, 1994; Tsumuki *et al.*, 2007)。

入侵害虫的遗传多样性及其扩张趋势研究, 是入侵生物学的重要研究内容之一 (万方浩等, 2005)。Fang *et al.* (2005) 利用 AFLP (amplified fragment length polymorphisim) 技术分析以色列不同地理种群西花蓟马的遗传结构, 发现各种群内部具有很高的遗传多样性。张治军 (2007) 利用该技术研究西花蓟马 7 个不同地理种群 (北京、云南、新西兰、荷兰、美国、澳大利亚和日本), 分析结果表明, 不同地区的西花蓟马种群之间存在明显的遗传分化; 聚类分析结果显示, 北京种群与荷兰种群聚为一支, 推测北京的西花蓟马可能来自荷兰。沈荣登等 (2011) 应用核糖体 DNA 中的内转录间隔区 ITS2 (internal transcribed spacer 2) 基因序列对云南各地理种群西花蓟马的遗传结构及其分化进行初步研究, 结果表明各地理种群间的遗传分化程度很低, 种群间存在基因交流。

本研究针对西花蓟马在我国传播扩散迅速但其遗传结构尚不明晰的问题, 以采自我国 13 个地理区域的西花蓟马为靶标, 采用 COI 分子标记技术, 研究分析我国西花蓟马不同地理种群的遗传结构和遗传多样性, 研究结果对深入探讨我国西花蓟马的入侵来源、传播扩散途径及其有效阻截具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

根据入侵物种传播扩散的可能途径以及我国各省/直辖市工农业发展的特点,以我国经济比较

发达的沿海城市、旅游胜地以及矿产资源比较丰富的地区为主要采集区域,进行西花蓟马的系统采集。本研究中,供试西花蓟马样品的采集信息如表 1 所示。

表 1 不同地理种群西花蓟马采集信息
Table 1 Collecting information of *F. occidentalis* from different geographical populations

编号 No.	采集地点 Locality	代码 Code	经纬度 Latitude, longitude	寄主 Host plant	样品数量(头) No. sample	时间 Date	登录号* Accession no. *
1	北京丰台 Fengtai, Beijing	FT	39.83°N,116.36°E	玫瑰 <i>Rosa rugosa</i> Thunb	20	2010-09-03	XHJM. 2010. 100070. 1 ~ XHJM. 2010. 100070. 20
2	河北石家庄 Shijiazhuang, Hebei	SJZ	38.02°N,114.54°E	多花蔷薇 <i>Rose multiflora</i> Thunb	8	2009-06-09	XHJM. 2009. 050004. 1 ~ XHJM. 2009. 050004. 8
3	山西太原 Taiyuan, Shanxi	TY	37.86°N,112.56°E	白三叶草 <i>Trrifolium repens</i> L.	7	2009-06-28	XHJM. 2009. 030001. 1 ~ XHJM. 2009. 030001. 7
4	内蒙古包头 Baotou, Neimenggu	BT	40.65°N,109.82°E	矮牵牛 <i>Petunia hybrida</i> Vilm	7	2009-09-12	XHJM. 2009. 014010. 1 ~ XHJM. 2009. 014010. 7
5	辽宁沈阳 Shenyang, Liaoning	SY	41.81°N,123.4°E	万寿菊 <i>Tagetes erecta</i> L.	5	2009-07-21	XHJM. 2009. 110031. 1 ~ XHJM. 2009. 110031. 5
6	吉林四平 Siping, Jilin	SP	43.17°N,124.37°E	红王子锦带花 <i>Weigela florida</i> (Bunge) A. DC. cv. Red Prince	5	2009-08-29	XHJM. 2009. 136000. 1 ~ XHJM. 2009. 136000. 5
7	黑龙江哈尔滨 Harbin, Heilongjiang	HEB	45.68°N,129.02°E	大丽花 <i>Dahlia pinnata</i> Cav.	20	2009-08-06	XHJM. 2009. 151811. 1 ~ XHJM. 2009. 151811. 20
8	山东青岛 Qingdao, Shandong	QD	36.32°N,120.4°E	白三叶草 <i>T. repens</i>	27	2009-05-25	XHJM. 2009. 266109. 1 ~ XHJM. 2009. 266109. 27
9	河南洛阳 Luoyang, Henan	LY	34.65°N,112.41°E	小叶女贞 <i>Ligustrum quihoui</i> Carr.	8	2009-05-31	XHJM. 2009. 471003. 1 ~ XHJM. 2009. 471003. 8
10	云南昆明 Kunming, Yunnan	KM	25.13°N,102.75°E	波斯菊 <i>Cosmos bipinnatus</i> Cav.	25	2008-06-14	XHJM. 2008. 650224. 1 ~ XHJM. 2008. 650224. 25
11	陕西宝鸡 Baoji, Shaanxi	BJ	34.38°N,107.13°E	美人蕉 <i>Canna indica</i> L.	7	2009-06-21	XHJM. 2009. 721000. 1 ~ XHJM. 2009. 721000. 7
12	甘肃兰州 Lanzhou, Gansu	LZ	36.04°N,103.83°E	天竺葵 <i>Pelargonium hortorum</i> Bailey	16	2009-09-22	XHJM. 2009. 730000. 1 ~ XHJM. 2009. 730000. 16
13	宁夏银川 Yinchuan, Ningxia	YC	38.48°N,106.27°E	鸡冠花 <i>Celosia cristata</i> L.	20	2009-09-16	XHJM. 2009. 750001. 1 ~ XHJM. 2009. 750001. 20
合计 Total	13 个种群 13 geographical populations				175		175 条 175 sequences

* 中国主要外来入侵昆虫 DNA 条形码识别系统。
* Database of invasive alien species in China (<http://www.chinaias.cn>).

1.2 总 DNA 提取

西花蓟马总 DNA 的提取参照 Moritz *et al.* (2001) 的方法并稍加改进。用软毛毛笔轻轻挑取单头蓟马,放在滴有 20 μL 提取缓冲液(50 mmol · L⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol · L⁻¹ EDTA, 1% SDS, 20 mmol · L⁻¹ NaCl, pH 8.0)的 Parafilm 膜上,以 0.2 mL PCR 管底部作为匀浆器,充分研磨,匀浆液移入 1.5 mL 离心管;用 50 μL 缓冲液清洗匀浆器和 Parafilm 膜 4 次,移入同一

离心管;加入 5 μL 蛋白酶 K(20 mg · mL⁻¹),充分混匀后于 60 ℃ 水浴 1 h(中途混匀 1 次);加入 220 μL 氯仿/异戊醇(*v: v* = 24: 1),轻柔混匀数十次后,冰浴 30 min;以 4 ℃、12000 r · min⁻¹ 离心 20 min,取上清液(约 200 μL)并加入 440 μL 预冷无水乙醇,轻轻混匀后在 -20 ℃ 冰箱放置 30 min;取出后,于 4 ℃、12000 r · min⁻¹ 离心 20 min,弃去上清液;加入 440 μL 预冷 75% 乙醇洗涤,4 ℃、12000 r · min⁻¹ 离心 15 min,弃去上清液。将离心管倒扣于

洁净滤纸上,自然干燥 20 min,每管加入 20 μL 超纯水,充分溶解后于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。以生物分光光度计测定 DNA 浓度,以 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值确定其是否被污染。

1.3 PCR 扩增、电泳检测以及序列测定

COI 基因序列扩增所使用的 DNA 条形码标准引物 LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') 和 HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3')(Folmer *et al.*, 1994),由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 反应体系 25 μL ,其中模板 DNA 2 μL (约 500 ng),10 $\times$ buffer (含 Mg^{2+})2 μL ,dNTPs($0.2\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)0.5 μL ,上游引物和下游引物($5\text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$)各 0.5 μL ,Taq DNA 聚合酶(1.0 U)0.2 μL 。反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;30 个循环:94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,48 $^{\circ}\text{C}$ 50 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 50 s;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。取 5 μL PCR 扩增产物,加 2 μL 上样缓冲液(0.25% 溴酚兰,40% 蔗糖水溶液),以 DNA Marker 为参照,在含有染色剂 GoldView 的 1.5% 的琼脂糖凝胶上进行电泳分离(电泳液为 $0.5 \times \text{TBE}$),85 V 电泳 45 min 后,以 GelDoc Universal Hood II 型凝胶成像系统分析结果。将经电泳检测验证合格的 PCR 产物送北京三博远志生物技术有限责任公司测序(单向测序)。根据标本数量及 PCR 产物的质量,每个地理种群检测西花蓟马 5~25 头(表 1),共计检测 175 头,并将 175 条序列录入中国主要外来入侵昆虫 DNA 条形码识别系统(<http://www.chinaias.cn>)(表 1)。

1.4 序列分析

1.4.1 序列校对及人工比对 Bioedit 软件读取 COI 基因序列,对每条序列的碱基进行人工读取和反复校对。校正后的碱基序列在 NCBI 上进行同源性比对,以确保所获得的序列为目的基因片段。

1.4.2 遗传多样性分析 应用 DnaSP 5.0(Librado & Rozas, 2009)和 MEGA 4.0 软件(Kumar *et al.*, 2008)分析西花蓟马各地理种群 COI 基因的序列特征及单倍型多样性(haplotype diversity, Hd)。

序列特征分析主要包括序列的多态性位点(variable/polymorphic sites, V)、碱基组成(base composition)、转换(transition, Ti)和颠换(transversion, Tv)位点数、转换/颠换偏倚率(Ti/Tv bias, R)。多态性位点包括自裔位点(singleton variable sites, Si)和简约信息位点(parsimony informative

sites, Pi)。在 DNA 序列中,碱基恒定的位点和只出现一次变异的位点即为自裔位点;至少有 2 种变异类型在该位点出现 2 次或 2 次以上的,称为简约信息位点。碱基组成主要是指, DNA 序列中 4 种碱基 A、T、C、G 的相对含量。碱基的替换方式有 2 种,即转换和颠换,A 与 G 之间或者 C 与 T 之间的替换称为转换,A、G 与 C、T 之间的替换称为颠换。

单倍型多样性是指在给定群体中随机抽取到 2 个不同单倍型的频率,单倍型多样性高的种群说明其遗传多样性高,遗传资源丰富。核苷酸多样性(nucleotide diversity, π)是指在给定群体中随机选取的 COI 基因序列间的平均每个位点的核苷酸差异数目,是衡量一给定群体遗传多态性的重要指标, π 值越大,种群的多样性程度越高(彭奕欣和黄诗笺, 1997)。应用 DnaSP 5.0 软件分析各地理种群的单倍型多样性和核苷酸多样性(Librado & Rozas, 2009),同时进行 Tajima's D 中性检验,以明确其是否遵循中性模型(Tajima, 1989)。

1.4.3 遗传分化和基因流分析 固定指数(genetic fixations index, Fst)表示不同种群间等位基因频率的变异,是反映种群进化历史的重要参数,可在一定程度上揭示种群间基因流和遗传漂变的程度。基因流(gene flow, Nm)指基因在种群内和种群间的运动(Grant, 1985),包括基因从一个种群到另一种群成功运动的所有机制(Slatkni, 1985)。基因流可揭示群体间可能的基因渗透及影响遗传分化的遗传现象。基因流越大,群体间的相似性越大。固定系数与基因流之间的关系为 $Nm = 1/(Fst + 1)$ (Hmailton, 1999)。应用 DnaSP 5.0 软件(Librado & Rozas, 2009)计算各地理种群间的固定指数和基因流。

固定指数 Fst 和基因流 Nm 是表示种群遗传分化程度的重要指标。 Fst 值越大,表明遗传分化越明显, Nm 值与之相反, Nm 值越大说明种群间基因交流越充分,遗传分化越小。 $0 < Fst \leq 0.05$,种群间几乎没有发生分化; $0.05 < Fst \leq 0.15$,种群间分化较小; $0.15 < Fst \leq 0.25$,种群间发生中度分化; $Fst > 0.25$,种群间分化明显; Fst 值为负数,表示 2 个种群之间没有遗传分化(Balloux & Lugon-Moulin, 2002)。 $Nm < 1$,说明群体可能由于遗传漂变而发生了分化; $Nm > 1$,表明群体间的基因交流水平较高,群体间遗传分化较小; $Nm > 4$,种群间的基因交流更为充分,遗传分化更小; Nm 值为负数,表示 2

个种群间无基因交流 (Allendorf, 1983; Millar & Libby, 1991)。

分子变异分析 (analysis of molecular variance, AMOVA) 是在分子水平上分析种群遗传结构的工具 (Excoffier *et al.*, 2005), 根据单倍型或基因型间的进化距离 (evolutionary distance) 对各种群间的遗传差异进行等级划分, AMOVA 具有分子数据便于直接计算离差方的优点, 本研究应用 Arlequin 3.0 软件进行分子变异分析 (Excoffier *et al.*, 2005)。

1.4.4 系统发育树的构建 采用 MEGA 4.0 软件按照 Kimura 双参数模型计算系统发育重建所需的遗传距离 (Kumar *et al.*, 2008), 以邻接法 (neighbor-joining method, NJ) 构建单倍型系统发育树, 发育树分支的置信度采用自展法 (bootstrap analysis, BP) 重复检测 1000 次。

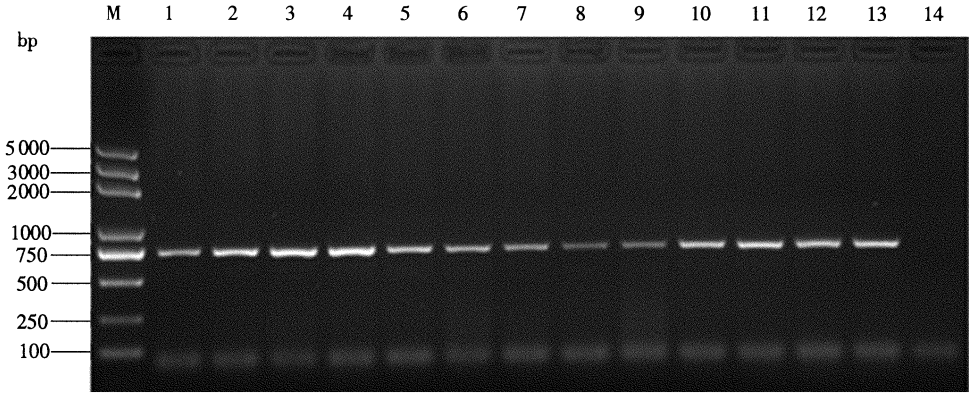


图 1 引物 LCO1490/HCO2198 对不同地理种群西花蓟马 COI 基因扩增结果电泳检测图

Fig. 1 Amplification pattern of the COI gene of *F. occidentalis* from 13 geographical populations using the universal primers LCO1490/HCO2198
M: DNA 分子质量标准; 1 ~ 13: 西花蓟马不同地理种群, 编号同表 1; 14: 阴性对照 (超纯水)。

M: DNA ladder marker; 1 ~ 13: Different geographical populations, same as in table 1; 14: Negative control (ultra-pure water)。

2.2 西花蓟马 COI 基因序列变异分析

对西花蓟马不同地理种群共计 175 条 COI 基因序列进行变异分析 (表 2), 共检测到 596 个保守位点, 35 个多态性位点, 多态性位点数占序列总长的 5.55%, 其中含有 12 个自裔位点, 23 个简约信息位点。自裔位点分别位于第 22、41、93、101、102、125、126、414、444、565、567 和 585 位; 简约信息位点分别位于第 84、111、183、213、255、270、294、357、366、378、385、399、411、447、499、504、531、543、558、588、598、606 和 612 位。所有序列的碱基平均含量分别为, A: 31.1%, T: 38.1%, C: 14.5%, G: 16.3%, A + T: 69.2%。所有序列的总突变数 (total number of mutations, η) 为 70, 其中发生转换的位点数为 57, 发生颠换的位点数为 13, 转换/颠换偏倚率为

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增、序列测定及同源性分析

以每个地理种群的单头西花蓟马 DNA 为模板, 通用型引物 LCO1490/HCO2198 进行 PCR 扩增, 电泳检测结果显示, 每个地理种群的西花蓟马均可扩增出清晰的靶标片段 (长度约为 690 bp) (图 1)。对电泳检测验证合格的 PCR 产物进行纯化和序列测定, 得到西花蓟马 13 个地理种群共计 175 条 COI 基因序列。将所有序列采用 ClustalX 软件比对, 修剪成长度为 631 bp 的标准片段进行分析。利用 NCBI 中的 BLAST 程序进行同源性比对, 结果显示与数据库中已公开的西花蓟马 COI 基因序列的同源性为 99% ~ 100%, 表明所获得的西花蓟马的 COI 基因序列准确可靠。

4.093 (表 2)。

2.3 单倍型分布及遗传多样性分析

在所检测的西花蓟马 13 个地理种群 175 条序列中, 共检测到 13 种单倍型 (haplotype, H) (H1 ~ H13)。其中, H2 为优势共享单倍型, 在 13 个种群中均有分布, 共享序列共计 80 条, 占序列总数的 45.7%; 其次为单倍型 H3, 除河北石家庄 SJZ 和山东青岛 QD 种群外, 在其他 11 个种群中均有分布, 占序列总数的 30.3%; 此外, 河北石家庄 SJZ、黑龙江哈尔滨 HEB 和宁夏银川 YC, 共享单倍型 H4, 所占比例为 8.6%; 山西太原 TY、山东青岛 QD 和云南昆明 KM, 共享单倍型 H6, 所占比例为 5.7%; 另有 9 种单倍型, 即 H1, H5, H7, H8, H9, H10, H11, H12 和 H13, 分别为北京丰台 FT、河北石家庄 SJZ、吉林

四平 SP、黑龙江哈尔滨 HEB、山东青岛 QD (H9, H10)、河南洛阳 LY、甘肃兰州 LZ 和宁夏银川 YC 等种群所特有(表 3)。

表 2 不同地理种群西花蓟马的 mtDNA COI 基因序列变异分析

Table 2 Results of mtDNA COI gene sequences of <i>F. occidentalis</i> from different geographical populations	
参数 Parameters	数值 Data
样本数量 Number of sequences	175
序列长度 Length of sequence (bp)	631
保守位点数 Number of conserved sites	596
变异位点数 Number of variable sites	35
自裔位点 Number of singleton variable sites	12
简约信息位点 Number of parsimony informative sites	2
总突变数 Total number of mutations (η)	70
转换数 Number of transitions	57
颠换数 Number of transversions	13
转换/颠换偏倚率 Transition/Transversion bias	4.093
A + T 含量 A + T content (%)	69.2

对单倍型多样性 Hd 和核苷酸多样性 π 进行分析,结果表明,总体单倍型多样性 Hd 0.691,不同地

理种群单倍型多样性范围 0.425 ~ 0.732,单倍型多样性最高和最低的种群分别为黑龙江哈尔滨 HEB ($Hd = 0.732$) 和甘肃兰州 LZ ($Hd = 0.425$); 总体核苷酸多样性 π 0.00652,不同地理种群核苷酸多样性范围 0.00070 ~ 0.01594,核苷酸多样度最高和最低的种群分别为宁夏银川 YC ($\pi = 0.01594$) 和云南昆明 KM ($\pi = 0.00070$)。对各种种群单倍型多样性 Hd 和核苷酸多样性 π 进行综合分析,结果表明各种群在地域上存在明显的种群多样性差异,其中,宁夏银川 YC ($Hd = 0.689, \pi = 0.01594$) 和黑龙江哈尔滨 HEB 种群 ($Hd = 0.732, \pi = 0.01506$) 具有较高的多态性,而内蒙古包头 BT 和陕西宝鸡 BJ 种群 ($Hd = 0.476, \pi = 0.00075$) 的多态性较低(表 4)。Tajima's D 中性进化模型检验结果显示,除河北石家庄 SJZ、黑龙江哈尔滨 HEB 和宁夏银川 YC 3 个种群外,其他种群的 Tajima's D 检验结果均未达到显著水平。该结果表明,除上述 3 个种群以外的其他种群的 mtDNA COI 基因的进化都遵循中性模型。

表 3 各单倍型在不同地理种群西花蓟马中的分布
Table 3 Haplotypes of mtDNA COI gene in different geographical populations of *F. occidentalis*

地理种群 Geographical population	单倍型 Haplotype (H)												
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13
FT	3	4	13										
SJZ		6		1	1								
TY		4	2			1							
BT		2	5										
SY		2	3										
SP		1	3				1						
HEB		6	7	6				1					
QD		14				5			6	2			
LY		4	3								1		
KM		12	9			4							
BJ		5	2										
LZ		12	3									1	
YC		8	3	8									1

FT:北京丰台; SJZ:石家庄; TY:太原; BT:包头; SY:沈阳; SP:四平; HEB:哈尔滨; QD:青岛; LY:洛阳; KM:昆明; BJ:宝鸡; LZ:兰州; YC:银川。
FT: Fengtai, Beijing; SJZ: Shijiazhuang; TY: Taiyuan; BT: Baotou; SY: Shenyang; SP: Siping; HEB: Harbin; QD: Qingdao; LY: Luoyang; KM: Kunming; BJ: Baoji; LZ: Lanzhou; YC: Yinchuan.

2.4 遗传分化及基因流分析

将所有种群作为一个整体进行分析,其总体固定系数 Fst 0.24359,变异范围 -0.05604 ~ 0.55271。总体基因流 Nm 0.78,变异范围 -40.04 ~ 35.75(表 5)。综合分析显示,我国西花蓟马各地理种群之间可能已发生一定的分化。其中,黑龙江哈尔滨 HEB 种群与北京丰台 FT、山西太原 TY、内蒙古包头 BT、

辽宁沈阳 SY、吉林四平 SP、山东青岛 QD、河南洛阳 LY、云南昆明 KM、陕西宝鸡 BJ 和甘肃兰州 LZ 等 10 个种群之间可能存在明显分化;宁夏银川 YC 种群与北京丰台 FT、山西太原 TY、内蒙古包头 BT、辽宁沈阳 SY、吉林四平 SP、山东青岛 QD、河南洛阳 LY、云南昆明 KM、陕西宝鸡 BJ 和甘肃兰州 LZ 等 10 个种群之间可能存在明显分化;北京丰台 FT 种

群与山西太原 TY、黑龙江哈尔滨 HEB、山东青岛 QD、云南昆明 KM、陕西宝鸡 BJ、甘肃兰州 LZ 和宁夏银川 YC 等 7 个种群之间可能存在明显分化,与河北石家庄 SJZ 种群之间存在中度分化;山东青岛 QD 种群与北京丰台 FT、内蒙古包头 BT、辽宁沈阳

SY、吉林四平 SP、黑龙江哈尔滨 HEB、河南洛阳 LY 和宁夏银川 YC 等 7 个种群之间可能存在明显分化,与陕西宝鸡 BJ、云南昆明 KM 和甘肃兰州 LZ 等 3 个种群之间可能发生了中度分化(表 5)。

表 4 西花蓟马不同地理种群 COI 基因单倍型、核苷酸多样性分析及中性检验

Table 4 Haplotype diversity, nucleotide diversity and Tajima's D neutrality test of *F. occidentalis* from different geographic populations

地理种群 Geographical population	测序数目 No. sequenced	单倍型数量 No. haplotypes	单倍型多样性 Haplotype diversity (<i>Hd</i>) (mean ± <i>SD</i>)	核苷酸多样性 Nucleotide diversity (<i>π</i>) (mean ± <i>SD</i>)	Tajima's D
FT	20	3	0.542 ± 0.105	0.00096 ± 0.00022	0.02839
SJZ	8	3	0.464 ± 0.200	0.00792 ± 0.00539	-1.83149 **
TY	7	3	0.667 ± 0.160	0.00121 ± 0.00037	-0.27492
BT	7	2	0.476 ± 0.171	0.00075 ± 0.00027	0.55902
SY	5	2	0.600 ± 0.175	0.00095 ± 0.00028	1.22474
SP	5	3	0.700 ± 0.218	0.00444 ± 0.00221	-1.16172
HEB	20	4	0.732 ± 0.043	0.01506 ± 0.00215	2.60706 **
QD	27	4	0.667 ± 0.069	0.00132 ± 0.00018	1.2766
LY	8	3	0.679 ± 0.122	0.00170 ± 0.00060	-0.30441
KM	25	3	0.640 ± 0.087	0.00070 ± 0.00014	1.02588
BJ	7	2	0.476 ± 0.171	0.00075 ± 0.00027	0.55902
LZ	16	3	0.425 ± 0.133	0.00131 ± 0.00068	-1.49119
YC	20	4	0.689 ± 0.060	0.01594 ± 0.00133	2.97956 **
合计 Total	175	13	0.691 ± 0.025	0.00652 ± 0.00106	-1.00687

** $P < 0.01$. FT:北京丰台; SJZ:石家庄; TY:太原; BT:包头; SY:沈阳; SP:四平; HEB:哈尔滨; QD:青岛; LY:洛阳; KM:昆明; BJ:宝鸡; LZ:兰州; YC:银川。

** $P < 0.01$. FT: Fengtai, Beijing; SJZ: Shijiazhuang; TY: Taiyuan; BT: Baotou; SY: Shenyang; SP: Siping; HEB: Harbin; QD: Qingdao; LY: Luoyang; KM: Kunming; BJ: Baoji; LZ: Lanzhou; YC: Yinchuan.

表 5 西花蓟马种群间固定指数 F_{st} (下三角形)和基因流 Nm (上三角形)

Table 5 Genetic fixation index (F_{st}) (lower triangular) and gene flow (Nm) (upper triangular) between geographical populations of *F. occidentalis*

地理种群 Geographical population	FT	SJZ	TY	BT	SY	SP	HEB	QD	LY	KM	BJ	LZ	YC
FT		1.08	0.72	-7.00	-11.93	-13.04	0.57	0.23	3.40	0.81	0.57	0.49	0.36
SJZ	0.18764		15.13	1.44	2.33	1.63	3.56	5.22	3.54	5.14	14.38	29.12	1.48
TY	0.25813	0.01626		1.34	35.75	2.34	0.64	1.76	-9.63	-2.98	-2.28	-5.75	0.41
BT	-0.03701	0.14815	0.15741		-1.66	-6.14	0.59	0.27	-8.13	1.52	1.03	0.70	0.37
SY	-0.02141	0.09677	0.00694	-0.17708		-7.08	0.62	0.41	-2.44	21.25	28.25	1.78	0.39
SP	-0.01954	0.13333	0.09662	-0.04242	-0.03659		0.70	0.61	33.87	2.71	2.15	1.39	0.44
HEB	0.30655	0.06568	0.27986	0.29849	0.28635	0.26227		0.57	0.66	0.63	0.63	0.63	-8.25
QD	0.52271	0.04569	0.12433	0.48494	0.38042	0.28941	0.30675		0.67	1.01	0.87	1.26	0.39
LY	0.06850	0.06593	-0.02667	-0.03175	-0.11429	0.00733	0.27557	0.27106		-40.06	-8.13	1.58	0.41
KM	0.25643	0.04636	-0.09153	0.14153	0.01163	0.08436	0.28395	0.19811	-0.00628		-8.54	6.60	0.40
BJ	0.30549	0.01709	-0.12346	0.19540	0.00877	0.10417	0.28558	0.22254	-0.03175	-0.03016		-4.71	0.40
LZ	0.33669	0.00851	-0.04549	0.26397	0.12308	0.15205	0.28324	0.16575	0.05179	0.03647	-0.05604		0.41
YC	0.41153	0.14444	0.37766	0.40485	0.39237	0.36410	-0.03127	0.38859	0.37825	0.38268	0.38397	0.37678	

FT:北京丰台; SJZ:石家庄; TY:太原; BT:包头; SY:沈阳; SP:四平; HEB:哈尔滨; QD:青岛; LY:洛阳; KM:昆明; BJ:宝鸡; LZ:兰州; YC:银川。

FT: Fengtai, Beijing; SJZ: Shijiazhuang; TY: Taiyuan; BT: Baotou; SY: Shenyang; SP: Siping; HEB: Harbin; QD: Qingdao; LY: Luoyang; KM: Kunming; BJ: Baoji; LZ: Lanzhou; YC: Yinchuan.

2.5 AMOVA 分子变异分析

AMOVA 分析结果显示,不同种群间的变异占总体变异的 12.4% ,同一种群内不同个体间变异占

87.6% ,表明引起种群总体变异的主要因素为种群内个体间的变异(表 6)。

表 6 西花蓟马各地理种群 mtDNA COI 基因序列间的分子变异分析

Table 6 Analysis of molecular variance among different geographical populations of *F. occidentalis*

变异来源 Source of variation	自由度 <i>df</i>	平方和 Sum of square	变异组成 Variance components	变异百分率 Variation (%)
种群间 Inter-population	12	10.462	0.04319	12.4
种群内 Intra-population	162	49.641	0.30643	87.6
总变异 Total	174	60.103	0.34962	100

2.6 西花蓟马各地理种群的系统进化分析

2.6.1 基于本研究的西花蓟马 13 个地理种群的系统进化分析 采用邻接法构建我国西花蓟马各地理种群不同单倍型的系统发育树,并对系统发育树显示的拓扑结构进行分析。结果显示,13 个单倍型并没有按照地理分布形成明显的分支格局,各单倍型分散在不同的地理种群中,没有形成明显的、系统的地理种群结构(图 2)。整体显示,系统发育树分为明显的两大支。第一支:共享单倍型 H2 的地理种群和共享单倍型 H5 的地理种群聚在一起,13 个地理种群都共享单倍型 H2,其中河北石家庄 SJZ 种群还共享单倍型 H5。此外,共享单倍型 H1、H3、H7、H11 和 H12 的地理种群聚在一起;其中,内蒙古包头 BT、吉林四平 SP、云南昆明 KM、山西太原 TY、宁夏银川 YC、河南洛阳 LY、北京丰台 FT、甘肃兰州 LZ、辽宁沈阳 SY、陕西宝鸡 BJ 和黑龙江哈尔滨 HEB 等 11 个种群共享单倍型 H3,北京丰台 FT 种群共享单倍型 H1,吉林四平 SP 种群共享单倍型 H7,河南洛阳 LY 种群共享单倍型 H11,甘肃兰州 LZ 种群共享单倍型 H12。同时,共享单倍型 H6、H9、H10 的地理种群聚在一起;其中,山东青岛 QD、山西太原 TY 和云南昆明 KM 等种群共享单倍型 H6,且山东青岛 QD 种群还共享单倍型 H9 和 H10(图 2)。第二支:共享单倍型 H4、H8、H13 的地理种群聚在一起,其中河北石家庄 SJZ、宁夏银川 YC 和黑龙江哈尔滨 HEB 等 3 个种群共享单倍型 H4,黑龙江哈尔滨 HEB 种群还共享单倍型 H8,宁夏银川 YC 种群共享单倍型 H13(图 2)。

2.6.2 结合数据库中已公开的西花蓟马不同地理种群的系统进化分析 基于本研究已获得的我国西花蓟马各地理种群不同单倍型 COI 基因序列,结合 GenBank 中已公开的国内外不同地理种群西花蓟马的高质量 COI 基因序列(片段大小为 433 ~ 680 bp)(表 7)[GenBank 中已公开的西花蓟马序列多为广泛存在的温室品系序列,只有新西兰的 6 条序列(EF555794 ~ EF555799)为羽扇豆品系序列]

(Rugman-Jones *et al.*, 2010),共同构建系统发育树;同时,进行单倍型(表 7)和系统发育关系分析。结果显示,系统发育树分成了明显的两大支(图 3)。

第一大支,包括 4 个分支。其中,第一分支:山西太原 TY(H2, *n* = 4)、甘肃兰州 LZ(H2, *n* = 12)、吉林四平 SP(H2, *n* = 1)、山东青岛 QD(H2, *n* = 14; H9, *n* = 6)、北京丰台 FT(H2, *n* = 4)、河南洛阳 LY(H2, *n* = 4)、黑龙江哈尔滨 HEB(H2, *n* = 6)、宁夏银川 YC(H2, *n* = 8)、云南昆明 KM(H2, *n* = 12)、陕西宝鸡 BJ(H2, *n* = 5)、辽宁沈阳 SY(H2, *n* = 2)、内蒙古包头 BT(H2, *n* = 2)和河北石家庄 SJZ(H2, *n* = 6; H5, *n* = 1)等 13 个种群与 GenBank 中的北京 Beijing(Beijing-2, *n* = 3)和云南 Yunnan(Yunnan-2, *n* = 4; Yunnan-3, *n* = 7)种群,以及国外的荷兰 Holland(Holland-5, *n* = 3; Holland-3, *n* = 8; Holland-6, *n* = 3)、澳大利亚 Australia(Australia-2, *n* = 9)、美国加利福尼亚 California(California-3, *n* = 6)和堪萨斯 Kansas(Kansas-2, *n* = 6; Kansas-1, *n* = 2)、新西兰 New Zealand(New Zealand-4, *n* = 5)和日本 Japan(Japan-1, *n* = 7)等种群聚在一起(图 3)。第二分支:吉林四平 SP(H3, *n* = 3; H7, *n* = 1)、黑龙江哈尔滨 HEB(H3, *n* = 7)、内蒙古包头 BT(H3, *n* = 5)、陕西宝鸡 BJ(H3, *n* = 2)、山西太原 TY(H3, *n* = 2)、河南洛阳 LY(H3, *n* = 3; H11, *n* = 1)、甘肃兰州 LZ(H3, *n* = 3; H12, *n* = 1)、北京丰台 FT(H3, *n* = 13; H1, *n* = 3)、辽宁沈阳 SY(H3, *n* = 3)、宁夏银川 YC(H3, *n* = 3)和云南昆明 KM(H3, *n* = 9)等 11 个种群与 GenBank 中的北京 Beijing(Beijing-4, *n* = 4)和云南 Yunnan 种群(Yunnan-4, *n* = 7),以及国外的荷兰 Holland(Holland-2, *n* = 1)、澳大利亚 Australia(Australia-1, *n* = 1)、美国加利福尼亚 California(California-1, *n* = 2)和肯尼亚 Kenya(Kenya-1, *n* = 1)等种群聚在一起(图 3)。第三分支:宁夏银川 YC(H4, *n* = 1; H13, *n* = 1)、黑龙江哈尔滨 HEB(H4, *n* = 8; H8, *n* = 1)、河北石家庄 SJZ(H4, *n* = 1)等种群与 GenBank 中的北京 Beijing(Beijing-1, *n* =

1) 和云南 Yunnan (Yunnan-1, $n = 1$) 种群, 以及国外的新西兰 New Zealand (New Zealand-2, $n = 1$; New Zealand-3, $n = 5$) 和荷兰 Holland (Holland-4, $n = 1$) 等种群聚在一起 (图 3)。第四分支: 山东青岛 QD ($H6, n = 5$; $H10, n = 2$)、云南昆明 KM ($H6, n = 4$) 和山西太原 TY ($H6, n = 1$) 等种群与 GenBank 中的北

京 Beijing 种群 (Beijing-3, $n = 3$), 以及国外的新西兰 New Zealand (New Zealand-1, $n = 1$)、荷兰 Holland (Holland-1, $n = 1$)、美国的加利福尼亚 California (California-2, $n = 4$) 和纽约 New York (New York-1, $n = 1$; New York-2, $n = 2$) 及英国 UK (UK-1, $n = 1$) 等种群聚在一起 (图 3)。

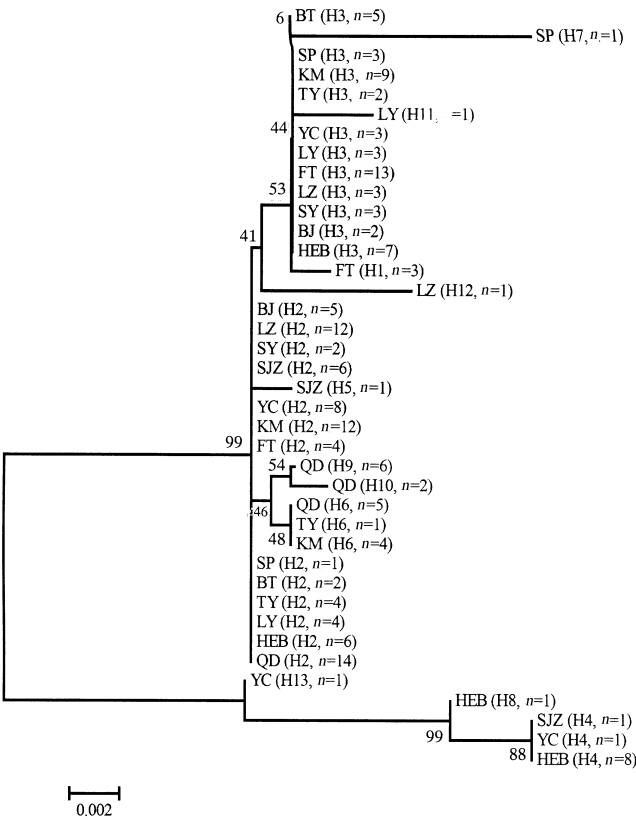


图 2 邻接法构建的我国西花蓟马各地理种群不同单倍型系统发育树

Fig. 2 Neighbor-joining tree based on the analysis of the 13 haplotypes of *F. occidentalis* from different geographical populations in China
分支处上方数值表示重复 1000 次后的自展值 ($>50\%$); 标尺示遗传距离。BT: 内蒙古包头; SP: 吉林四平; KM: 云南昆明;
TY: 山西太原; LY: 河南洛阳; YC: 宁夏银川; LZ: 甘肃兰州; BJ: 陕西宝鸡; HEB: 黑龙江哈尔滨;
SY: 辽宁沈阳; QD: 山东青岛; FT: 北京丰台; SJZ: 河北石家庄。
Numbers on branches are bootstrapped values ($>50\%$) under 1000 replicates, the scale bar represents genetic distance. BT: Baotou, Neimenggu;
SP: Siping, Jilin; KM: Kunming, Yunnan; TY: Taiyuan, Shanxi; LY: Luoyang, Henan; YC: Yinchuan, Ningxia;
LZ: Lanzhou, Gansu; BJ: Baoji, Shaanxi; HEB: Harbin, Heilongjiang; SY: Shenyang, Liaoning;
QD: Qingdao, Shandong; FT: Fengtai, Beijing; SJZ: Shijiazhuang, Hebei.

第二大支, 南非 South Africa (South Africa-1, $n = 1$; South Africa-2, $n = 2$) 和意大利 Italy 种群 (Italy-1, $n = 1$; Italy-2, $n = 1$) 聚在一起, 但未包含本研究的任一种群 (图 3)。

在国外的所有序列中, 只有单倍型编号为 New Zealand-2 (GenBank 登录号: EF555799) 和 New Zealand-3 (GenBank 登录号: EF555794 ~ EF555798) 的序列为新西兰西花蓟马的羽扇豆品系序列 (Rugman-Jones *et al.*, 2010), 其余为广泛分布的温室品系序列。聚类分析还显示, 宁夏银川 YC 种群的 2

条序列 ($H4, n = 1$; $H13, n = 1$)、黑龙江哈尔滨 HEB 种群的 9 条序列 ($H4, n = 8$; $H8, n = 1$)、河北石家庄 SJZ 种群的 1 条序列 ($H4, n = 1$) 以及 GenBank 中北京 Beijing 种群的 1 条序列 (Beijing-1, $n = 1$) 和云南 Yunnan 种群的 1 条序列 (Yunnan-1, $n = 1$), 与新西兰西花蓟马的羽扇豆品系序列 (GenBank 登录号: EF555794 ~ EF555799) 聚在一起, 表明我国的北京、云南以及宁夏银川、黑龙江哈尔滨、河北石家庄等部分地区已存在一定数量的西花蓟马羽扇豆品系。此外, 荷兰的 1 条序列 (Holland-4, $n = 1$) 也与

新西兰的羽扇豆品系序列聚在一起,表明荷兰亦存在西花蓟马的羽扇豆品系(图 3)。本研究中 13 个地理种群的其余序列,均为温室品系序列,其可能的入侵来源推测如下:河北石家庄 SJZ 种群的序列与荷兰、澳大利亚、美国加利福尼亚、美国堪萨斯、新西兰、日本等种群的序列聚在一起,推测该种群可能来源于上述 6 个国家或地区(图 4A);北京丰台 FT、河南洛阳 LY、黑龙江哈尔滨 HEB、辽宁沈阳 SY、吉林四平 SP、宁夏银川 YC、陕西宝鸡 BJ、内蒙古包头 BT、山西太原 TY、甘肃兰州 LZ 等 10 个种群的序列与荷兰、澳大利亚、美国加利福尼亚、美国堪萨斯、新西兰、日本、肯尼亚等种群的序列聚在一

起,推测我国上述 10 个区域的西花蓟马可能来源于这 7 个国家或地区(图 4B);山东青岛 QD 种群的序列与荷兰、澳大利亚、美国加利福尼亚、美国堪萨斯、新西兰、日本、美国纽约、英国等种群的序列聚在一起,推测该种群可能来源于上述这 8 个国家或地区(图 4C);云南昆明 KM 种群的序列与荷兰、澳大利亚、美国加利福尼亚、美国堪萨斯、新西兰、日本、肯尼亚、美国纽约、英国等种群的序列聚在一起,推测该种群可能来源于上述这 9 个国家或地区(图 4D)。此结果说明,我国西花蓟马温室品系的各地理种群存在多个入侵来源。

表 7 NCBI 数据库中西花蓟马不同地理种群高质量 COI 基因序列登录号

Table 7 Accession numbers of partial COI gene sequences of different geographical populations of <i>F. occidentalis</i> from GenBank							
地点 Locality	单倍型编号 Haplotype no.	登录号 Accession no.					
云南 Yunnan, China	Yunnan-1	JF719599					
	Yunnan-2	JF719595	JF719596	JF719597	JF719598		
	Yunnan-3	EF555805	EF555806	EF555836	EF555845	EF555846	EF555847
		EF555848					
	Yunnan-4	EF555873	EF555877	EF555878	EF555879	EF555882	EF555884
		EF555886					
	Beijing-1	EF555799					
	Beijing, China	Beijing-2	EF555807	EF555819	EF555841		
		Beijing-3	EF555864	EF555866	EF555869		
		Beijing-4	EF555871	EF555880	EF555881	EF555885	
新西兰 New Zealand	New Zealand-1	EF555855					
	New Zealand-2	EF555799					
	New Zealand-3	EF555794	EF555795	EF555796	EF555797	EF555798	
	New Zealand-4	EF555800	EF555801	EF555820	EF555830	EF555832	
澳大利亚 Australia	Australia-1	EF555872					
	Australia-2	EF555800	EF555808	EF555811	EF555813	EF555822	EF555835
		EF555842	EF555844	EF555849			
	日本 Japan	Japan-1	EF555817	EF555818	EF555828	EF555829	EF555833
荷兰 Holland		EF555838					EF555834
	Holland-1	EF555861					
	Holland-2	EF555876					
	Holland-3	EF555823	EF555809	EF555815	EF555816	EF555824	EF555826
		EF555850	EF555851				
	Holland-4	HQ605959					
	Holland-5	HQ697596	HQ697597	HQ697598			
	Holland-6	HQ605956	HQ605957	HQ605958			
南非 South Africa	South Africa-1	AM932021					
	South Africa-2	AM932022	AM932023				
意大利 Italy	Italy-1	AM932025					
	Italy-2	AM932026					
肯尼亚 Kenya	Kenya-1	FN545993					
	英国 UK	UK-1	FN545981				
加利福尼亚 California, USA	California-1	EF555887	EF555889				
	California-2	EF555854	EF555853	EF555862	EF555868		
	California-3	EF555802	EF555803	EF555821	EF555827	EF555837	EF555843
	堪萨斯	Kansas-1	EF555812	EF555856			
Kansas, USA	Kansas-2	EF555825	EF555831	EF555858	EF555860	EF555865	EF555867
	纽约	EF555859					
	New York, USA	EF555857	EF555888				

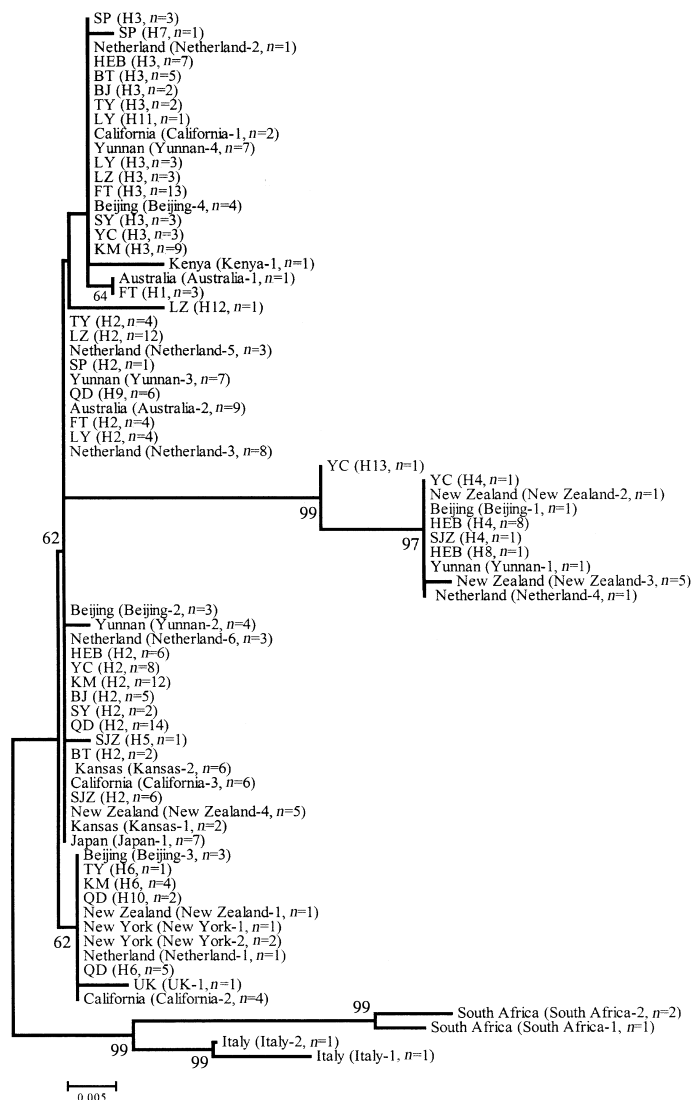


图 3 邻接法构建的西花蓟马不同地理种群 COI 基因序列系统发育树

Fig. 3 Neighbor-joining tree based on analysis of COI gene sequences of *F. occidentalis* from different geographical populations 分支处上方数值表示重复 1000 次后的自展值 (>50%) ; 标尺示遗传距离。BT: 内蒙古包头; SP: 吉林四平; KM: 云南昆明; TY: 山西太原; LY: 河南洛阳; YC: 宁夏银川; LZ: 甘肃兰州; BJ: 陕西宝鸡; HEB: 黑龙江哈尔滨; SY: 辽宁沈阳; QD: 山东青岛; FT: 北京丰台; SJZ: 河北石家庄; Beijing: 北京; Yunnan: 云南; New Zealand: 新西兰; Australia: 澳大利亚; Japan: 日本; Holland: 荷兰; South Africa: 南非; Italy: 意大利; Kenya: 肯尼亚; UK: 英国; California: 加利福尼亚; Kansas: 堪萨斯; New York: 纽约。Numbers on branches are bootstrapped values (>50%) under 1000 replicates, the scale bar represents genetic distance. BT: Baotou, Neimenggu; SP: Siping, Jilin; KM: Kunming, Yunnan; TY: Taiyuan, Shanxi; LY: Luoyang, Henan; YC: Yinchuan, Ningxia; LZ: Lanzhou, Gansu; BJ: Baoji, Shaanxi; HEB: Harbin, Heilongjiang; SY: Shenyang, Liaoning; QD: Qingdao, Shandong; FT: Fengtai, Beijing; SJZ: Shijiazhuang, Hebei.

3 小结与讨论

本研究利用 mtDNA COI 基因序列分析我国西花蓟马的种群多样性和遗传结构,并以此推测西花蓟马的来源和传播扩散途径。研究涉及我国西花蓟马 13 个地理种群。研究结果显示,无论是西花蓟马种群的覆盖度还是每一种群的样本数量,均符合研究物种种群遗传关系分析的基本需求 (Zhang *et al.*, 2010)。

对西花蓟马 13 个地理种群共计 175 条 COI 基

因碱基序列进行变异分析,共检测到 596 个保守位点,35 个多态性位点,其中自裔位点 12 个,简约信息位点 23 个。所有序列中 A + T 含量为 69.2%,表现出明显的 A/T 碱基偏向性,与昆虫线粒体基因组的碱基组成特征基本一致 (Simon *et al.*, 1994)。Kinght & Mindell (1993) 研究指出,转换/颠换偏倚率的临界值为 2,当小于 2 时表明基因突变已达到饱和状态,大于 2 时表明基因突变尚未达到饱和状态。本研究中 13 个西花蓟马地理种群所有序列的

总突变数 η 为 70,发生转换和颠换的位点数分别为 57 和 13,转换/颠换偏倚率为 4.093,说明我国西花蓟马 COI 基因碱基序列的突变尚未达到饱和状态。

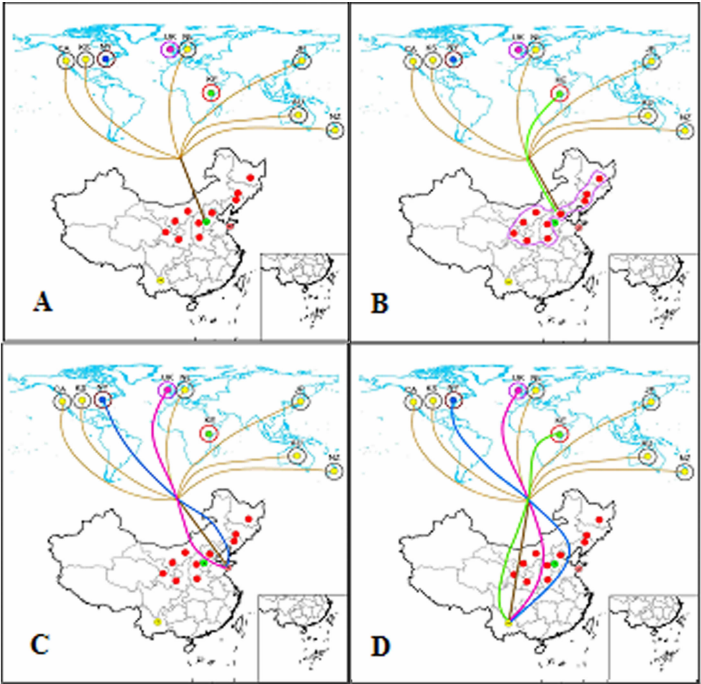


图 4 西花蓟马河北石家庄 SJZ (A)、北京丰台 FT、河南洛阳 LY、黑龙江哈尔滨 HEB、辽宁沈阳 SY、吉林四平 SP、宁夏银川 YC、陕西宝鸡 BJ、内蒙古包头 BT、山西太原 TY、甘肃兰州 LZ (B)、山东青岛 QD (C) 和云南昆明 KM (D) 等种群入侵来源地示意图

Fig. 4 Diagram showing the sources of *F. occidentalis* of Shijiazhuang, Hebei (A), Fengtai, Beijing; Luoyang, Henan; Harbin, Heilongjiang; Shenyang, Liaoning; Siping, Jilin; Yinchuan, Ningxia; Baoji, Shaanxi; Baotou, Neimenggu; Taiyuan, Shanxi; and Lanzhou, Gansu (B), Qingdao, Shandong (C) and Kunming, Yunnan (D) populations
绿色圆圈表示河北石家庄 SJZ 种群; CA:加利福尼亚; KS:堪萨斯; NY:纽约; UK:英国;
NL:荷兰; KE:肯尼亚; JP:日本; AU:澳大利亚; NZ:新西兰。
Green circle indicates population Shijiazhuang, Hebei; CA: California; KS: Kansas; NY: New York; UK: United Kingdom;
NL: Holland; KE: Kenya; JP: Japan; AU: Australia; NZ: New Zealand.

单倍型多样性 Hd 和核苷酸多样性 π 是衡量一个种群线粒体 DNA 遗传多样性的 2 个重要指标。本研究对 13 个西花蓟马地理种群、175 条 COI 基因序列的单倍型多样性和核苷酸多样性的检测结果显示,13 个地理种群共有 13 种单倍型。进一步的综合分析显示,其总体单倍型多样性较高,为 0.691;但核苷酸多态性较低,仅为 0.00652。其中,黑龙江哈尔滨 HEB、宁夏银川 YC、云南昆明 KM、山东青岛 QD、河南洛阳 LY、山西太原 TY、辽宁沈阳 SY 等种群均表现出较低的单倍型多样性;而核苷酸多样性较高的种群只有黑龙江哈尔滨 HEB 和宁夏银川 YC 种群,从而可能会使这 2 个种群与我国目前发现的 83% 以上的种群发生遗传分化。因此,我国西花蓟马可能是由一较小的有效种群迅速增长而来,虽然通过变异积累了一定的单倍型多样

性,但却尚未积累足够的核苷酸序列多样性(Avise, 1998)。

固定指数 Fst 和基因流 Nm 是衡量种群遗传分化的重要指标。本研究对西花蓟马 13 个地理种群总体以及各种群之间的固定指数 Fst 和基因流 Nm 的分析结果显示,各地理种群间可能存在一定程度的分化,其中黑龙江哈尔滨 HEB、宁夏银川 YC、北京丰台 FT、山东青岛 QD 等种群与其他种群之间可能出现了明显分化。而不同种群间出现遗传分化的原因,一方面可能是由于不同的地理分布区域,其温度、湿度、寄主植物等环境因素不同,进而导致西花蓟马在适应不同的环境条件过程中可能出现一定的遗传分化;另一方面可能与西花蓟马的入侵来源地不同有关;而后者所起作用可能更为重要。

武晓云等(2009)以 COI 基因通用型引物 mtD-

7.2F/mtD-9.2R 扩增北京、云南昆明、黑龙江哈尔滨等三地,共计 29 头西花蓟马的 COI 基因片段(长度为 433 bp,包含在本研究的 650 bp 靶标序列之中,对齐位置约从 200 bp 开始),通过聚类分析显示,上述三地的部分 COI 基因序列与数据库中已公开的新西兰西花蓟马的羽扇豆品系序列(EF555794 ~ EF555799)聚在一起,表明上述三地的种群都存在一定数量的羽扇豆品系,其来源地可能是新西兰。本研究以我国西花蓟马不同地理种群单倍型序列和国外不同地理种群单倍型序列共同构建系统发育树,聚类分析结果显示,我国西花蓟马亦存在 2 个品系,即羽扇豆品系和温室品系。我国的北京丰台、云南昆明、宁夏银川、黑龙江哈尔滨、河北石家庄种群中已存在一定数量的羽扇豆品系,上述区域的部分西花蓟马可能来源于新西兰或荷兰。而广泛存在于我国的不同地理种群的西花蓟马温室品系存在多个入侵来源地。

随着国际贸易以及国内地区之间水果、蔬菜、花卉及其种苗的调运或展览展示,可能导致同一地理种群的西花蓟马存在多个入侵来源,或同一来源的多次入侵,或多个来源的多次入侵。该研究结果对西花蓟马的有效阻截及其种群扩张趋势监测意义重大。

参考文献

刘佳,张林,卢焰梅,张宏瑞. 2010. 湖南外来入侵害虫西花蓟马初步调查. 安徽农业科学, 38(25): 13800 - 13801.

彭奕欣,黄诗笺. 1997. 进化生物学. 长沙: 武汉大学出版社.

任洁. 2006. 西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* (Pergande) 生物学特性及其控制技术. 杨凌: 西北农林科技大学.

沈登荣,张宏瑞,李正跃,董坤,和绍禹. 2011. 云南西花蓟马 rDNA-ITS2 遗传多态性及其种群扩张. 应用昆虫学报, 48(3): 504 - 512.

万方浩,郑小波,郭建英. 2005. 重要农林外来入侵物种的生物学与控制. 北京: 科学出版社.

王海鸿,雷仲仁,李雪,代安国,陈翰秋. 2013. 西藏发现重要外来入侵害虫——西花蓟马. 植物保护, 39(1): 187 - 189.

武晓云,程晓非,张仲恺,桂富荣,李正跃. 2009. 西花蓟马 (*Frankliniella occidentalis*) rDNA ITS2 和 COI 基因 5' 末端序列的克隆与比较分析. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 35(4): 355 - 364.

徐家菊,韦丽莉,禹崇云,包丽琼,林兴华,彭贵清,赵满云. 2005. 临沧市新发现外来有害生物——西花蓟马. 植

物检疫, 19(5): 23 - 24.

严丹侃,汤云霞,贺子义,孙雷,王鸣华,薛晓峰,范加勤. 2010. 南京地区西花蓟马发生调查及其分子检测. 南京农业大学学报, 33(4): 59 - 63.

杨华,崔元珩,张升,孙晓军. 2010. 危险性外来入侵生物——西花蓟马在新疆发生危害. 新疆农业科学, 47(11): 2252 - 2253.

袁成明,邹军锐,李景柱,张勇. 2008. 贵州省蔬菜蓟马的种类、分布及综合防治. 湖北农业科学, 47(12): 1442 - 1444.

张友军,吴青君,徐宝云,朱国仁. 2003. 危险性外来入侵生物——西花蓟马在北京发生危害. 植物保护, 29(4): 58 - 59.

张治军. 2007. 西花蓟马生物学特性及不同地理种群遗传分化研究. 北京: 中国农业大学.

郑长英,刘云虹,张乃芹,赵希丽. 2007. 山东省发现外来入侵有害生物西花蓟马. 青岛农业大学学报: 自然科学版, 24(3): 172 - 174.

Allendorf F W. 1983. Isolation, gene flow and genetic differentiation among populations // Schoneveld-Cox C M, Chambers S M, MacBryde B and Thomas W L. *Genetics and Conservation: A Reference for Managing Wild Animal and Plant Populations*. Benjamin/Cummings, New York, 51 - 65.

Argaman Q, Klein Z, Ben-Dov Y and Mendel Z. 1989. *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae), an injurious intruder. *Hassadeh*, 69: 1268 - 1269.

Avise J C. 1998. The history and preview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology*, 7: 371 - 379.

Balloux F and Lugon-Moulin N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11: 155 - 165.

Beshear R J J. 1983. New records of thrips in Georgia (Thysanoptera, Terebrantia, Tubulifera). *Journal of the Georgia Entomological Society*, 18: 342 - 344.

Brodsgaard H F. 1993. Cold hardiness and tolerance to submergence in water in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *Environmental Entomology*, 22: 647 - 653.

Brunner P C and Frey J E. 2010. Habitat-specific population structure in native western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Insecta, Thysanoptera). *Journal of Environmental Biology*, 23: 797 - 804.

Chung B K, Kang S W and Kwon J H. 2000. Chemical control system of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) in greenhouse eggplant. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 3: 1 - 9.

Excoffier L, Laval G and Schneider S. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics

- data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47–50.
- Fang J, Kritzman A, Yonash N, Gera A, Pollak N and Lavi U. 2005. Genetic variation of thrips populations assessed by amplified fragment length polymorphism (Thysanoptera: Thripidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 98: 351–358.
- Fauziah I and Saharan H A. 1991. *Research on Thrips in Malaysia*. Asian Vegetable Research and Development Center Publication.
- Felland C M, Hull L A, Teulon D A J and Cameron E A. 1993. Overwintering of western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae) in Pennsylvania. *The Canadian Entomologist*, 125: 971–973.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R and 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.
- Gerin C, Hance T and Van Impe G. 1994. Demographical parameters of *Frankliniella occidentalis*. *Journal of Applied Entomology*, 118: 370–377.
- Giliomee J H. 1989. First record of western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) in South Africa. *Journal of the Entomological Society of Southern Africa*, 52: 179–180.
- Grant V. 1985. *The Evolutionary Process: A Critical Review of Evolutionary Theory*. New York: Columbia University Press.
- Hayase T and Fukuda H. 1991. Occurrence of the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande), on the cyclamen and its identification. *Plant Protection*, 45: 59–61.
- Hmailton M B. 1999. Tropical tree gene flow and seed dispersal. *Nature*, 401: 129–130.
- Kinght A and Mindell D P. 1993. Substitution bias, weighting of DNA sequences evolution, and the phylogenetic positions of fea's viper. *Systematic Biology*, 42: 18–31.
- Kirk W D J and Terry L I. 2003. The spread of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Agricultural and Forest Entomology*, 5: 301–310.
- Kumar S, Nei M, Dudley J and Tamura K. 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, 9: 299–306.
- Librado P and Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451–1452.
- Malipatil M B, Postle A C, Osmelak J A, Hill M and Moran J. 1993. First record of western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) in Australia. *Journal of the Australian Entomological Society*, 32: 378.
- Martin N A and Workman P J. 1994. Confirmation of a pesticide-resistant strain of western flower thrips in New Zealand // *Proceedings of the 47th New Zealand Plant Protection Conference, Horticultural Crops*, 144–148.
- Millar C L and Libby W J. 1991. Strategies for conserving clinal, ecotypic, and disjunct population diversity in widespread species // Fald D A and Holsinger K E. *Genetics and Conservation of Rare Plants*. New York: Oxford University Press, 149–170.
- Moritz G, Paulsen M, Delker C, Piel S and Kumm S. 2001. Identification of thrips using ITS-RFLP analysis // Marullo R and Mound L A. *Thrips and Tosporiviruses; Proceedings of the 7th International Symposium on Thysanoptera*. Canberra: Australian National Insect Collection CSIRO Publishing, 365–367.
- Rugman-Jones P F, Hoddle M S and Stouthamer R. 2010. Nuclear-mitochondrial barcoding exposes the global pest western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae) as two sympatric cryptic species in its native California. *Journal of Economic Entomology*, 103: 877–886.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H and Flook P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87: 651–701.
- Slatkin M. 1985. Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 16: 393–430.
- Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis for DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585–595.
- Tsumuki H, Ishida H, Yoshida H, Sonoda S, Izumi Y and Murai T. 2007. Cold hardiness of adult western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae). *Applied Entomology and Zoology*, 42: 223–229.
- Vierbergen G. 1999. Risks of Thysanoptera detected on imported plant products: the Dutch experience // Vierbergen G and Tunç I. *Proceedings 6th International Symposium on Thysanoptera*. Akdeniz University, Antalya, Turkey, 99–106.
- Zhang A B, He L J, Crozier R H, Muster C and Zhu C D. 2010. Estimating sample sizes for DNA barcoding. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54: 1035–1039.