# 基于 CO I 基因片段的石榴螟遗传多样性

刘 东<sup>1</sup>,徐新龙<sup>2</sup>,努尔艾孜孜·努尔麦麦提<sup>1</sup>,张秀英<sup>3</sup>,陈光辉<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>喀什海关技术中心,新疆 喀什 844000;<sup>2</sup>阿拉山口海关技术中心,新疆 阿拉山口 833418;

3喀什大学生命与地理科学学院/新疆帕米尔高原生物资源与生态重点实验室,新疆喀什 844000

摘要:【目的】石榴螟是一种重要的检疫性有害生物,但我国尚未有分布记录。该虫寄主范围广,危害性大,而该虫的寄主在我国分布广泛,因此,开展基于线粒体 COI基因的石榴螟遗传多样性和系统发育分析研究,有助于认识世界种群的遗传多样性及各国种群的遗传关系,对进出口商品检疫监管具有重要指导意义。【方法】收集世界各个国家和地区公开的石榴螟种群信息,应用石榴螟线粒体 COI基因序列,进行遗传多样性、系统发育、遗传分化情况分析。【结果】结合截获样品扩增的 COI基因测序后的序列进行遗传多样性分析发现,世界范围内石榴螟种群存在 18 个单倍型。单倍型 Hap\_2 为分布最广泛的单



开放科学标识码 (OSID 码)

倍型,分布于突尼斯、意大利、马耳他、希腊、伊朗、澳大利亚、美国,本次截获的样本均为此单倍型。在多个国家分布的还有 Hap\_4、Hap\_8、Hap\_11、Hap\_154种单倍型。系统发育分析表明,世界范围内12个国家和地区的石榴螟种群聚为2支,澳大 利亚2个地区的种群出现了分化。【结论】本研究明确了世界范围内的石榴螟具有高度遗传同质性,仅澳大利亚的2个单 倍型出现分化;该物种的变异主要来源于种群之间;COI基因显示出高单倍型多样性,世界范围内的种群反应出较高程度 的遗传多样性和中高度水平的遗传分化。

关键词:检疫性有害生物;石榴螟;COI基因;遗传多样性

# Genetic diversity analysis of *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae) based on CO | gene sequences

LIU Dong<sup>1</sup>, XU Xinlong<sup>2</sup>, NUERAIZIZI · Nuermaimaiti<sup>1</sup>, ZHANG Xiuying<sup>3</sup>, CHEN Guanghui<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Technology Center of Kashi Customs, Kashi, Xinjiang 844000, China; <sup>2</sup>Alashankou Customs Technology Center, Alashankou, Xinjiang 833418, China; <sup>3</sup> College of Life and Geographic Sciences, Key Laboratory of Biological Resources and Ecology of Pamirs Plateau in Xinjiang Uygur Autonomous Region, Kashi University, Kashi, Xinjiang 844000, China

Abstract: [Aim] *Ectomyelois ceratoniae* is a moth pest that damages pomegranate trees, but it has not yet invaded China. This pest has a wide host range and is highly harmful; its hosts are widely distributed in China. Therefore, conducting genetic diversity and phylogenetic analyses of pomegranate moths based on the mitochondrial CO I gene can clarify the genetic diversity of world populations and the genetic relationships among populations in different countries, which is important as a guide for the quarantine and supervision of import and export commodities. [Method] Information on pomegranate moth populations publicly available in various countries and regions around the world was collected, and the mitochondrial COI gene sequence of the pomegranate moth was used for the analysis of genetic diversity, phylogeny, and genetic differentiation. [Result] Combined with the analysis of the genetic diversity of COI gene sequences amplified from intercepted samples, it was observed that 18 haplotypes of pomegranate moth populations were reported worldwide. Hap\_2 was the most widely distributed haplotype in Tunisia, Italy, Malta, Greece, Iran, Australia, and the United States, and all samples intercepted in this study belonged to this haplotype. In addition, four haplotypes, Hap\_4, Hap\_8, Hap\_11, and Hap\_15, were distributed across multiple countries. Phylogenetic analysis grouped the pomegranate moth populations in 12 countries and regions worldwide into two branches, and the populations in the two areas of Australia were differentiated. [Conclusion] This study shows that the pomegranate moths invading various countries worldwide have high genetic homogeneity, with only two haplotypes in Australia showing differentiation. Variation in this species mainly comes from between populations;

the COI gene shows a high haplotype diversity, and the populations worldwide show a high degree of genetic diversity and a moderate to high level of genetic differentiation.

Key words: quarantine pests; Ectomyelois ceratoniae; CO I gene; genetic diversity

石榴螟 Ectomyelois ceratoniae (Zeller) 属鳞翅目 Lepidoptera 螟蛾科 Pyralidae 斑螟亚科 Phycitinae, 是被海关总署列入《中华人民共和国进境植物检疫 性有害生物名录》中的检疫性有害生物(朱崧琪等, 2021)。该虫起源于地中海地区,目前欧洲、亚洲、 非洲、北美洲和大洋洲等地均有分布报道,我国尚 未有分布记录。该虫可寄生于扁桃 Prunus dulcis (Mill.) D. A. Webb、核桃 Juglans regia L.、甜樱桃 Prunus avium Linn.、石榴 Punica granatum L.、温饽 Cydonia oblonga Mill.、无花果 Ficus carica Linn.、苹 果 Malus pumila Mill.、杧果 Mangifera indica L.、阿月 浑子 Pistacia vera L.、柑橘 Citrus reticulata Blanco 等 42 种植物。主要通过幼虫和蛹随寄主植物运输实 现远距离传播(陈乃中,2009; 徐淼锋等,2015)。

在中东地区,石榴螟为石榴、椰枣 Phoenix dactylifera L.等作物的主要害虫,每年造成 30%~80% 的作物损失(Danaye-Tous et al., 2022)。在突尼斯, 石榴螟分布在该国北部和南部,主要危害海枣、石 榴、柑橘这几种重要的经济植物(Hached et al., 2021)。在南非,石榴螟为柑橘的一种次要害虫 (Marsberg et al., 2015)。在美国加州,石榴螟每年 可对椰枣造成 10%~40% 的损失 (Nav & Perring, 2009)。石榴螟危害石榴时,雌虫将卵产在石榴花 萼处或者果皮的裂缝处,卵孵化成幼虫,从果冠或 果皮的裂缝处钻入果实内部,幼虫以种子和果肉为 食,每年在石榴上发生3~5代,最后一代幼虫在秋 季结束时在果实内部进入滞育阶段。幼虫的取食 会导致靠近花瓣的果皮上出现褐色病斑。晚期造 成果实空心、裂果、烂果,不能上市销售。严重受损 的石榴内部呈黑色,完全被霉菌感染(Heydari & Ieadi, 2014; Mamay, 2018)

随着石榴产业的不断发展,我国西部地区的新 疆、四川、云南、陕西,中部地区的山西、河北、河南、 安徽、湖南,东部地区的山东等省份选育出了较多 的优质种质资源(刘春等,2022),在国内形成了以 新疆叶城、陕西临潼、河南荥阳、安徽怀远、山东枣 庄等为代表的中国石榴主产区(王博等,2017)。据 初步统计,截至2021年,我国石榴栽培面积约8.67 万hm<sup>2</sup>,产量约130万t(侯乐峰等,2022)。目前, 在我国危害石榴果实的主要害虫为桃蛙螟Dichocrocis punctiferalis Guenée、橘小实蝇Bactrocera dorsalis (Hendel)、铜绿丽金龟Anomala corpulenta Motsehulsiy、井上蛙果斑螟Assara inouei Yamanaka (何平等, 2015;刘娜等,2023),其中井上蛙果斑螟是危害云 南石榴的重要蛙果害虫(何超等,2017,2020),井上 蛙果斑螟在危害方式及造成的损失方面与石榴螟 十分相似。我国各地海关多次在旅客携带物中截 获石榴螟(吕海英,2016;章柱等,2015),其存在入 侵我国的可能性,一旦该物种入侵,其定殖风险和 防治难度均较高。

基因瓶颈、杂交作用、多倍体、压力诱导的基因 组突变这些因素,会影响入侵生物的入侵(Prentis et al.,2008)。对这些因子的深入了解对于揭示入 侵生物的生物学特性并制定有效的防治措施十分 重要(马琳等,2021)。通过分析物种的遗传多样性 数据和遗传结构信息,对于深入了解该入侵生物的 定殖、扩散、暴发等过程,以及其在侵入地的适应能 力等方面具有重要意义(马琳,2020)。

本研究应用石榴螟线粒体 COI 基因序列,收集 世界各个国家和地区公开的石榴螟种群信息,进行 遗传多样性、系统进化发育、遗传分化特征分析,以 期制定有效的生物入侵防控策略。

# 1 材料与方法

# 1.1 供试样本

本研究材料靶标样品来自伊尔克什坦海关截 获巴旦木干果中发现的幼虫尸体。将虫体保存在 含有无水乙醇的 EP 管中,-20 ℃冰箱中保存,用作 DNA 提取材料。

# 1.2 PCR 扩增及测序

取虫体部分组织于 1.5 mL 离心管中,加入 1 mL 灭菌 H<sub>2</sub>O,将清洗液涡旋混匀后丢弃,进行 2 次 清洗,并使用滤纸将表面吸干。使用灭菌的玻璃研 磨棒将虫体磨碎,处理好的样品使用 TaKaRa 基因 组 DNA 提取试剂盒提取(离心柱法),提取的核酸 使用微量紫外分光光度计读取其 D<sub>260/280</sub> 值及浓度 值,核酸样本于-20 ℃长期保存。

引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合 成,引物序列为LCO1490:GGTCAACAAATCATA-AAGATATTGG,HCO2198:TAAACTTCAGGGTGAC-CAAAAAATCA (Folmer *et al.*,1994)。用提取模板 进行 PCR 的扩增,扩增体系为25 µL,Mix 12.5 µL, 上下游引物(10 mol·L<sup>-1</sup>)各1 µL,ddH<sub>2</sub>O,模板 60 ~120 ng。PCR反应程序:95 ℃预变性4 min;95 ℃ 变性45 s,45 ℃退火 60 s,72 ℃延伸 60 s,共循环 40 次,4 ℃保存(陈光辉等,2021)。

取 5 μL PCR 产物,使用 1.5%的琼脂糖凝胶进 行电泳,以 DNA Marker 为参考,在凝胶成像仪下检 测目标条带扩增情况。具有明亮扩增条带的样品 送至安徽通用生物技术公司进行双向测序。

# 1.3 序列比对及遗传多样性分析

运用 SeqMan Pro 7.1.0 程序对测序得到的序列 进行了校对和拼接, 剔除两端峰图质量不佳的序 列,最终拼接后的片段长度为 634 bp。将结果在 NCBI 数据库中验证比对, 确认扩增片段(傅卫民 等, 2024)。利用 MEGA 7 软件进行多重序列比对, 对碱基组成、变异位点以及各核苷酸含量的比例进 行分析。应用 DnaSP 6.12 软件(Rozas *et al.*,2017) 计算全球范围内不同国家和地区石榴螟的 CO I 序 列的多态性位点数量(S)、单倍型数(H)、单倍型多 样性( $H_d$ )、核苷酸多样性( $P_i$ )和平均核苷酸差异 数(K)。分析单倍型数及单倍型在世界各种群的 分布情况。

# **1.4** 世界范围的石榴螟种群遗传多样性和系统发 育分析

在 BOLD 网站下载世界已经公开的石榴螟 CO I序列(表1),记录经纬度信息,计算各个种群的 地理距离的自然对数值。在 MEGA 7 软件(Kumar et al.,2016)中剪切出本研究相关序列并进行多重 序列比对分析,以印度谷螟 Plodia interpunctella (Hübner)为外群,使用邻接法(Saitou & Nei,1987) 构建基于不同国家和地区的单倍型的系统发育树, 计算遗传距离,使用 NTSYSpc-2.10e 软件(Peakall & Smouse,2006),根据地理距离的自然对数值和遗 传距离数值进行 Mantle 相关性检验,分析地理距离 与遗传距离之间的关联性(呼晓庆和杨兆富,2019; 李菁等,2010)。

种群代码 Population	国家和地区 Country and region	GenBank 登录号/BOLD 序列编号 Accession number of GenBank/sequence ID of BOLD	下载序列个数 Number of download sequences
POP01	马达加斯加 Madagascar	MH417781 \MH415596 \MH417343 \MH417697	4
POP02	南非 South Africa	JF748065 \OQ836430 \OQ836431 \OQ836366-OQ836368 \KP083440-KP083444	11
POP03	突尼斯 Tunisia	KU896479-KU896488、 GWOTP046-GWOTP051、 GWOTP781-GWOTP783、 GWOTP785-GWOTP795	30
POP04	肯尼亚 Kenya	KM612270	1
POP05	意大利 Italy	GWORB4118-14、GWORB4126-14	2
POP06	马耳他 Malta	MW305785, MW305786	2
POP07	希腊 Greece	LEASV572-19 \LEASW1501-20 \BSNTN111-23 \BSNTN126-23	4
POP08	克罗地亚 Croatia	NLON615-19	1
POP09	伊朗 Iran	KX866639 \MG489932-MG489943 \MH460551 \MN900745-MN900748	18
POP10	澳大利亚 Australia	KF404735、KF397550、KF405701、KF400731、WALPA1901-12、WALPA563- 12、WALPD156-15	7
POP11	美国 America	LNAUU175-15	1
POP12	JH	Sample1b,Sample 2b,Sample 3b,Sample 4b	4
POP13	葡萄牙 Portugal	OQ562917	1

表1 各个国家和地区公开的石榴螟的 CO I 基因序列 Table 1 COI sequences of *E. ceratoniae* from publicly available in various countries and regions

# 1.5 种群扩张情况及遗传分化分析

为了解各地理种群的扩张情况,使用 DnaSPv 6.12 软件对各地理种群进行 Tajima's D、Fu's  $F_s$  检 验及核苷酸错配分布(mismatch-distribution)分析。 运用 PopART 软件(Leigh & Bryant, 2015)基于 TCS Nework 构建石榴螟单倍型关系网络图。利用 Arlequin 3.5 软件(Excoffier & Lischer, 2010)完成不同 地理种群间遗传分化系数  $F_{sT}$ 及分子方差(AMO-VA)分析,通过  $F_{sT}$ 计算基因流  $N_m$  值,了解石榴螟 遗传变异在群体之间和群体内部的分布情况。

# 2 结果与分析

# 2.1 序列比对及种群遗传多样性

以截获的幼虫核酸为模板,对部分 CO I 基因 进行扩增,测序后得到了 626 bp 长度的序列。在 NCBI 网站进行石榴螟 CO I 基因序列比对,发现该 序列与其相似度大于 99.8%,从而确定其为目标片 段。比较分析 4 条序列,在碱基替换中仅有一个位 点发生了转换。在碱基组成上,A、T、C、G 4 种碱基 的平均含量分别为 29.3%、39.3%、15.7%、15.5%, (A+T)占比 68.6%,(G+C)占比31.2%,A/T 碱基偏 向性显著,符合鳞翅目昆虫线粒体基因的碱基组成 特征(Chai et al.,2012; Liu et al.,2018)。

本研究共收集到包括南非、突尼斯、伊朗、澳大利亚等共11个国家和地区的82条 COI 基因序列。 以上序列与截获的4条序列,共计86条序列。

在 352 bp 的目标序列中共检测到保守位点 (conserved sites, c) 330 个,占全长的 93.8%,变异 位点(variable sites, v) 21 个,占全长的 6.0%,单变 异位点(singleton sites, s) 5 个,占全长的 1.4%,其 中简约性信息位点(parsimony informative site) 16 个,占总位点数的 4.5%。信息表明,多态位点是由 碱基的转换产生,无颠换或碱基的插入和缺失。

遗传多样性分析发现,世界范围内的石榴螟多

态性位点数量(S)为21,单倍型数(H)为18,单倍 型多样性(H<sub>d</sub>)为0.721,核苷酸多样性(P<sub>i</sub>)为 0.00658,平均核苷酸差异数(K)为2.308。

单倍型 Hap\_2 分布最广泛,分布于突尼斯、意 大利、马耳他、希腊、伊朗、澳大利亚、美国,本次截 获样本均为此单倍型,多个国家分布的还有 Hap\_ 4、Hap\_8、Hap\_11、Hap\_15 4 种单倍型。单倍型 Hap\_1、Hap\_3 仅在澳大利亚分布,Hap\_5、Hap\_6 仅 在南非分布,Hap\_9 仅在伊朗分布,Hap\_12 仅在葡 萄牙分布,Hap\_16 仅在肯尼亚分布,Hap\_7、Hap\_ 10、Hap\_13、Hap\_14 仅在突尼斯分布,Hap\_15、Hap \_17 仅在希腊分布,Hap\_18 仅在马达加斯加分布。 单倍型 Hap\_2 仅在温带分布,在热带分布的单倍型 有 Hap\_1、Hap\_3、Hap\_4、Hap\_16、Hap\_18,单倍型 Hap\_4 分布于热带与温带区域。

表 2 显示了 13 个地理种群、1 个截获物种群的 遗传多样性数据。世界范围内种群的单倍型多样 性为 0.721, 伊朗种群的单倍型多样性最低为 0.216, 希腊与澳大利亚的单倍型多样性最高(0.833); 世 界范围内种群的核苷酸多样性为 0.00658, 澳大利 亚种群的核苷酸多样性最高为 0.01757, 伊朗加种 群的核苷酸多样性最低为 0.00063。

种群 Population	国家和地区 Country and region	$H_{\rm a}$	$H_{\mathrm{d}}$	$P_{\rm i}$	K	单倍型分布(个体数) Haplotype (number of individuals)
POP01	马达加斯加 Madagascar	2	0.500	0.00142	0.500	Hap_4 (3) Hap_18 (1)
POP02	南非 South Africa	3	0.473	0.00196	0.691	Hap_4 (8) Hap_5 (2) Hap_6 (1)
POP03	突尼斯 Tunisia	7	0.703	0.00423	1.487	Hap_2 (14) 、Hap_7 (1) 、Hap_8 (1) 、Hap10 (2) 、 Hap_11 (9) 、Hap_13 (1) 、Hap_14 (2)
POP04	肯尼亚 Kenya	1	0	0	0	Hap_16 (1)
POP05	意大利 Italy	1	0	0	0	Hap_2 (2)
POP06	马耳他 Malta	2	1.000	0.00568	2.000	Hap_2 (1) Hap_11 (1)
POP07	希腊 Greece	3	0.833	0.00284	1.000	Hap_2 (2) Hap_15 (1) Hap_17 (1)
POP08	克罗地亚 Croatia	1	0	0	0	Hap_11 (1)
POP09	伊朗 Iran	3	0.216	0.00063	0.222	Hap_2 (16) Hap_8 (1) Hap_9 (1)
POP10	澳大利亚 Australia	3	0.833	0.01757	6.167	Hap_1 (3) Hap_2 (3) Hap_3 (1)
POP11	美国 America	1	0	0	0	Hap_2 (1)
POP12	JH	1	0	0	0	Hap_2 (4)
POP13	葡萄牙 Portugal	1	0	0	0	Hap_12 (1)
_	全世界 Worldwide	16	0.721	0.00658	2.305	-

表 2 基于 CO I 基因的石榴螟 13 个地理种群遗传多样性分析 Table 2 Genetic diversity of mitochondrial COI gene of 13 E. ceratoniae

 $H_a$ :单倍型数; $H_d$ :单倍型多样性; $P_i$ :核苷酸多样性;K:平均核苷酸差异数。

 $H_{\rm a}$ : Number of haplotypes;  $H_{\rm d}$ : Haplotype diversity;  $P_{\rm i}$ : Nucleotide diversity; K: Average number of nucleotide differences.

# 2.2 系统发育分析

从系统发育树可以看出,86个基因分为两大支

系,一支包含澳大利亚2个单倍型,另一支为除澳 大利亚2单倍型以外的全部种群(图1)。 单倍型网络图(图3)中不同颜色代表一个地 理种群,圆面积与单倍型频率成正比。总体呈现星 状分布,说明了石榴螟的种群扩张情况。单倍型 Hap\_2出现频率最高,存在于7个地理种群中,Hap \_4、Hap\_11存在于3个地理种群中、Hap\_8、Hap\_15 存在2个地理种群中。Hap1、Hap3与其他单倍型 呈现出明显地理分布格局,形成2个主要分支,与 系统发育分析结果一致。

根据地理距离的自然对数值和遗传距离数值 (表3)进行 Mantle 相关性检验,检验结果显示,*R*= 0.20215,*P*=0.9945>0.05,表明石榴螟种群的地理 距离和遗传距离无明显相关性。





表 3 基于 COI 序列石榴螟 18 个单倍型种群的地理距离(km)自然对数值(上三角)遗传距离(下三角) Table 3 The natural logarithm of geographical distance (km) (above the diagonal) and pairwise genetic distance (below the diagonal) among 18 genehaplotypes of *E. ceratoniae* based on COI sequence

种群 Population	Hap_1	Hap_2	Hap_3	Hap_4	Hap_5	Hap_6	Hap_7	Hap_8	Hap_9	Hap_10	Hap_11	Hap_12	Hap_13	Hap_14	Hap_15	Hap_16	Hap_17	Hap_18
Hap_1		7.74	7.67	9.386	9.403	9.403	9.604	9.28	9.28	9.604	9.571	9.686	9.595	9.613	9.513	9.629	9.52	9.226
Hap_2	0.034		7.84	9.244	9.245	9.245	9.652	9.367	9.367	9.652	9.628	9.749	9.653	9.661	9.572	9.693	9.583	9.146
Hap_3	0.003	0.031		9.203	9.234	9.234	9.491	9.128	9.128	9.491	9.457	9.599	9.487	9.501	9.389	9.531	9.401	8.987
Hap_4	0.034	0.003	0.031		6.695	6.695	8.87	8.92	8.92	8.87	8.884	8.99	8.906	8.872	8.863	8.954	8.886	7.99
Hap_5	0.037	0.006	0.034	0.003		N/A	8.933	9.019	9.019	8.933	8.953	9.027	8.969	8.933	8.944	9.006	8.964	8.223
Hap_6	0.037	0.003	0.034	0.006	0.009		8.933	9.019	9.019	8.933	8.953	9.027	8.969	8.933	8.944	9.006	8.964	8.223
Hap_7	0.037	0.009	0.034	0.011	0.014	0.011		8.322	8.322	N/A	6.184	7.367	5.677	4.949	7.166	8.416	7.082	8.809
Hap_8	0.031	0.003	0.028	0.006	0.009	0.006	0.011		N/A	8.321	8.201	8.621	8.296	8.355	7.943	8.431	7.367	8.555
Hap_9	0.037	0.003	0.034	0.006	0.009	0.006	0.011	0.006		8.321	8.201	8.621	8.296	8.355	7.943	8.431	7.367	8.555
Hap_10	0.037	0.009	0.034	0.011	0.014	0.011	0.006	0.011	0.011		6.184	7.367	5.677	4.949	7.166	8.416	7.082	8.809
Hap_11	0.034	0.006	0.031	0.009	0.011	0.009	0.003	0.009	0.009	0.003		7.582	5.958	6.431	6.118	6.931	6.569	8.787
Hap_12	0.037	0.009	0.034	0.011	0.014	0.011	0.006	0.011	0.011	0.006	0.003		7.363	7.284	7.936	8.698	7.88	9.002
Hap_13	0.037	0.003	0.034	0.006	0.009	0.006	0.011	0.006	0.006	0.011	0.009	0.011		5.894	7.108	6.491	7.192	8.834
Hap_14	0.037	0.009	0.034	0.011	0.014	0.011	0.006	0.011	0.011	0.006	0.003	0.006	0.011		7.27	8.436	7.43	8.822
Hap_15	0.037	0.003	0.034	0.006	0.009	0.006	0.011	0.006	0.006	0.006	0.009	0.011	0.006	0.011	$\langle \cdot \rangle$	8.253	5.308	8.702
Hap_16	0.034	0.006	0.031	0.003	0.006	0.009	0.014	0.009	0.009	0.014	0.011	0.014	0.009	0.014	0.009		8.304	7.692
Hap_17	0.034	0.003	0.031	0.006	0.009	0.006	0.011	0.006	0.006	0.011	0.009	0.011	0.006	0.011	0.006	0.003		8.735
Hap_18	0.031	0.006	0.028	0.003	0.006	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.006	0.009	0.009	0.009	0.009	0.006	0.009	

N/A: 缺省 Default。

# 2.3 遗传分化分析

种群遗传分化系数( $F_{sr}$ )和基因流是衡量种群 间的遗传分化程度以及各种群间基因交流情况的 重要参数(Ma et al.,2015)。 $F_{sr}$ >0.25,表明种群之 间出现了极度的分化;0.15< $F_{sr}$ <0.25,说明种群之 间出现了高度分化;0.05 <  $F_{sr}$ <0.25,说明种群之 间出现了中度分化; $F_{sr}$ <0.05,表明 2 个种群的基因 型非常相似,没有发生遗传分化(欧阳慧丽等, 2021;张瑞玲等,2017)。表4结果显示,固定系数 ( $F_{sr}$ )均值为0.25314,可见石榴螟种群间出现了不 同程度的分化,而地理种群 POP01 与 POP02、 POP03 与 POP05、POP05 与 POP06、POP11、POP12 基因极度相似,无遗传分化发生。

○ 当种群间的基因流( $N_m$ )值在 0~1 时,说明 2 个种群之间由于遗传漂变而发生了遗传分化;当  $N_m$ 在 1~4 时,表明 2 个种群之间发生了较低水平 的遗传分化;当 $N_m$ 大于 4 或为负数时,说明 2 个种 群之间的基因交流频繁,在一定程度上阻碍了种群 间的遗传分化(欧阳慧丽,2022)。表 4 结果显示, POP01 与 POP02 出 现 基 因 流 最 大 值 ( $N_m$  = 88.40248),POP09 与 POP12 出现基因流最小值 ( $N_m$ =-2.08164)。

表 4	基于 CO 」	I序列的石榴螟1	3个地理种群间基因流	$ \widehat{N}_{m}( 上三角) 与固定 $	系数 <i>F</i> <sub>ST</sub> (下三角
	ш, сс.		• 1•0•±11#113±A3		

Table 4 Pairwise  $N_{\rm m}$  (above the diagonal) and  $F_{\rm ST}$  (below the diagonal) values among

13 geographic populations of E.	ceratoniae based on CO I sequence
---------------------------------	-----------------------------------

种群 Population	POP01	POP02	POP03	POP04	POP05	POP06	POP07	POP08	POP09	POP10	POP11	POP12	POP13
POP01		88.40248	0.32307	0.16667	0.10170	0.22222	0.18750	0.05556	0.06415	0.15038	0.16667	0.06250	0.03846
POP02	0.00282		0.25957	0.25676	0.23018	0.17943	0.22085	0.06934	0.11711	0.07768	0.35186	0.17096	0.04948
POP03	0.43625 *	0.49061 *		0.22142	5.58431	-0.97252	1.07521	-1.98467	0.62963	0.08213	-1.15949	1.31211	0.45757
POP04	0.60000	0.49333	0.53031		0.00000	0.50001	0.25000	0.00000	0.02941	0.50001	0.00000	0.00000	0.00000
POP05	0.71084	0.52064	0.04285	1.00000		-1.19999	-1.19999	0.00000	-1.00659	0.24584	N/A	0.00000	0.00000
POP06	0.52941	0.58217 *	-0.34601	0.33333	0.00000		2.00002	-0.50000	0.19243	0.30037	-0.50000	0.39999	N/A
POP07	0.57143 *	0.53095 *	0.18865 *	0.50000	-0.26316	0.11111		0.16667	1.06704	0.16350	-0.50000	N/A	N/A
POP08	0.81818	0.78286	-0.14412	1.00000	1.00000	-1.00000	0.60000		0.02941	0.50001	0.00000	0.00000	0.10000
POP09	0.79579	0.68100	0.28421	0.89474	-0.33043	0.56506	0.18982	0.89474		0.04499	-0.50000	-2.08164	0.00000
POP10	0.62441 *	0.76294 *	0.75271 *	0.33333	0.50419	0.45424	0.60460	0.33333	0.84750		0.59677	0.13603	0.01923
POP11	0.60000	0.41538	-0.27488	1.00000	0.00000	-1.00000	-1.00000	1.00000	-1.00000	0.29524		N/A	0.37756
POP12	0.80000 *	0.59388 *	0.16004	1.00000	0.00000	0.38462	0.00000	1.00000	-0.13649	0.64762	0.00000		0.00000
POP13	0.86667	0.83478	0.35332	1.00000	1.00000	0.00000	0.71429	1.00000	0.92857	0.39837	1.00000	1.00000	

 $N_{\rm m}$ =0.25×(1/F<sub>ST</sub>-1); \*: P<0.05; N/A: 缺省 Default<sub>o</sub>

# 2.4 中性检验分析

对各个地理种群进行中性检验分析,种群的 Tajima's D 和 Fu's F<sub>s</sub>均值分别为-0.35679 和 0.16811 (P>0.05),各种群未达到显著水平(表5), 表明石榴螟不同地理种群的遗传分化不明显;各地 理种群的 Tajima's D 值检测结果均未达到显著水 平,表明所有地理种群的遗传分化均不明显,表明 石榴螟通过入侵各个国家,形成稳定的基因型。

表 5	基于 COI 基因的石榴螟群体 Tajima's D 和 Fu's F <sub>s</sub> 检验
Table 5	Tajima's D and Fu's $F_s$ tests of E. ceratoniae based on COI gene

种群 Population	Tajima's D	Р	Fu's F <sub>s</sub>	Р
POP01	-0.61237	0.41100*	0.17185	0.31600*
POP02	-1.11391	0.21000 *	-0.11291	0.36400*
POP03	-0.46751	0.36500*	-1.38711	0.20000 *
POP04	0.00000	1.00000	0.00000	N/A
POP05	0.00000	1.00000	0.00000	N/A
POP06	0.00000	1.00000	0.69315	0.36800*
POP07	-0.70990	0.28500*	-0.88730	0.08400*
POP08	0.00000	1.00000	0.00000	N/A
POP09	-1.50776	0.04600 **	-1.74351	0.01400 **
POP10	-0.58365	0.37800*	1.83521	0.74500*
POP11	0.00000	1.00000	0.00000	N/A
POP12	0.00000	1.00000	0.00000	N/A
POP13	0.00000	1.00000	0.00000	N/A
均值 Mean	-0.35679	0.66714 *	0.16811	N/A

\*: P>0.05; \*\*\*: 0.01<P<0.05; \*\*\*\*: P<0.01; N/A: 缺省 Default。

#### 2.5 错配分布分析

若错配分布的实际观察结果与恒定或收缩的 期望模型相符,表明群体状态与期望模型一致;相 反,若实际观察结果与期望模型不符,曲线呈现单 峰形态,表明群体处于扩张状态(郑梓豪等,2021)。 由图 3 可见,POP01、POP03、POP06、POP07 种群的 分布为单峰形态,与期望的分布不一致,所以这些地区的种群经历过扩张,POP10种群的分布在图形中有多个凸起,综合分析来看,经历过多次种群扩张,POP02、POP09种群的分布与期望一致,表明这些种群在本区域发展较平稳。





#### 2.6 分子方差分析

通过使用分子方差分析方法 AMOVA,对研究 中的种群进行不同层级的分类和划分。该方法可 以估算出群体之间、群体内部以及个体之间在不同 层级的变异量在总变异量中所占的比例,从而揭示 变异的分布模式(陈佳琪等,2019)。对 13 个地理 种群进行分子方差分析,种间变异占52.55%,种群个体间变异占47.45%(表5)。研究结果表明,导致

种群变异的主要因素是种群之间的变异。

表 5 基于 CO I 基因的石榴螟群体分子方差分析 Table 5 AMOVA analysis of *E. ceratoniae* based on CO I gene

Table 5 Altro VI analysis of 2. containing based on CO T gene							
变异来源	自由度	平方和	方差组分	方差比率			
Source of variation	df	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation/%			
种群间 Among populations	12	47.831	0.62348	52.55			
种群内 Within populations	70	39.410	0.56300	47.45			
总变异 Total	82	87.241	1.18649				

# 3 讨论

石榴螟 COI 基因片段的遗传多样性分析表明, 截获的石榴螟属于 Hap\_2 单倍型是世界范围内分 布最广泛的一种。由系统发育树可知,不同国家的 单倍型分为两大支系,澳大利亚 2 个单倍型聚为一 支,其余单倍型聚为一支,与 Sedghiani *et al.* (2017)研究的突尼斯石榴螟分析结果一致。

Mantle 相关性检验结果显示,石榴螟种群的地 理距离和遗传距离无明显相关性。分子方差分析 (AMOVA)中,确定了种群内 47.45%的变异、种群 间 52.55%的变异,说明石榴螟种群变异主要来源 于种群之间。

本研究收集了世界范围内石榴螟种群共计86 条 CO I 基因序列,分析出18个线粒体单倍型,单 倍型多样性(*H*<sub>a</sub>)为0.721,显示出高单倍型多样性。 核苷酸多样性(*P*<sub>i</sub>)为0.00696,平均核苷酸差异数 (*K*)为2.450,也显示出石榴螟种群的遗传多样性。 由于核苷酸多样性的积累时间比单倍型多样性的 积累时间更长(陈佳琪等,2019),进一步表明石榴 螟在世界范围内经历了长期的历史演化,反应出较 高程度的遗传多样性和中高度水平的遗传分化。 在绘制单倍型分布地图时发现,单倍型 Hap\_2 仅分 布于温带区域,单倍型 Hap\_4 可分布于热带和温带 区域,其在世界范围的适生区域范围更大,因而潜 在风险更高。由于获得样本数限制,本文未能对石 榴螟开展进一步研究。

# 参考文献

- 陈光辉, 李焱, 张小菊, 胡红英, 2021. 检疫性有害生物枣 咔实蝇的快速分子鉴定. 寄生虫与医学昆虫学报, 28 (1): 46-54.
- 陈乃中,2009. 中国进境植物检疫性有害生物——昆虫卷. 北京:中国农业出版社.

- 陈佳琪,李潮,张雯君,李炜,高天扬,赵俊,2019.海南岛 宽额鳢(Channa gachua)群体遗传变异与生物地理过程. 生态学报,39(7):2591-2602.
- 傅卫民,刘志红,蔡波,李惠萍,吴福中,2024.基于 mtD-NA CO I 基因对榕属植物上粉蚧的分子鉴定和系统发育 分析.生物安全学报(中英文),33(1):12-18.
- 何超,沈登荣,尹立红,张睿,袁盛勇,田学军,2020.不同 基质及颜色背景对井上蛀果斑螟产卵生物学的影响. 植 物保护,46(5):116-121.
- 何超,沈登荣,尹立红,李锡良,袁盛勇,田学军,2017.井上 蛀果斑螟生物学特性研究.应用昆虫学报,54(2):292-297.
- 何平,余爽,陈建雄,刘大章,王友富,马川,张玲,李在 华,郑晓慧,2015.四川石榴病虫害及绿色防控技术.中 国植保导刊,35(9):20-23.
- 侯乐峰, 罗华, 毕润霞, 郝兆祥, 谭伟, 张立华, 2022. 我国 石榴育种四十年回顾与展望. 北方园艺 (24): 139-147.
- 呼晓庆,杨兆富,2019. 基于线粒体 CO I、Cytb 和 CO II 基 因的中国草地螟不同地理种群遗传分化分析. 昆虫学报, 62(6):720-733.
- 李菁,张颖,王振营,何康来,王强,2010. 基于线粒体 DNA COII 基因的亚洲玉米螟中国不同地理种群遗传分 化及基因流研究. 昆虫学报,53(10):1135-1143.
- 刘娜,刘艳,沈秋吉,闫振华,张睿,沈登荣,何超,2023. 光周期对井上蛀果斑螟生长发育及繁殖的影响. 植物保 护,49(2):215-219.
- 刘春,方锡佳,李锦锦,2022.中国石榴种质资源研究进展. 安徽农业科学(12):34-36,40.
- 吕海英,2016. 我国部分口岸截获蛾类鉴定及石榴螟检疫 风险性初步分析. 硕士学位论文. 太谷:山西农业大学.
- 马琳, 2020. 云南和新疆地区番茄潜叶蛾种群遗传变异和药 剂敏感性差异研究. 硕士学位论文. 南京:南京农业大学.
- 马琳,李晓维,郭文超,王树明,王田珍,吕要斌,2021. 基于 COI 基因的新入侵害虫番茄潜叶蛾遗传多样性分析. 应用昆虫学报,58(6):1356-1364.
- 欧阳慧丽,2022. 广西橘小实蝇遗传多样性研究. 硕士学位 论文. 南宁: 广西大学.
- 欧阳慧丽, 王帅, 陈超, 陆温, 郑霞林, 王小云, 2021. 基于

mt COI 片段广西橘小实蝇种群遗传分化研究. 广西植保, 34(2): 1-10.

- 王博, 万述伟, 翟光辉, 侯君合, 董军晓, 2017. 中国石榴 名优产区和栽培技术. 中国果菜, 37(7): 25-27.
- 徐森锋,张卫东,权永兵,迟远丽,黄永辉,廖力,2015.检疫 性害虫石榴螟的危害及鉴定.植物检疫,29(3):82-84.
- 郑梓豪,吴珊珊,魏勇,钟代斌,郑学礼,2021. 基于线粒 体 COI 基因分析广州市 15 个白纹伊蚊种群的遗传多样 性. 中国人兽共患病学报,37(11):985-994.
- 张瑞玲,姚广琴,潘晓倩,马德珍,赵爱华,张忠,2017.不 同地理种群白纹伊蚊线粒体基因 COI 的遗传多样性分 析.中国人兽共患病学报,33(4):316-320.
- 朱崧琪,梁柱伟,汪绍文,2021.《中华人民共和国进境植物 检疫性有害生物名录》更新项目简介.中国海关(7):54.
- 章柱,余辛,梁帆,2015. 广州机场局从旅客携带物多次截 获石榴螟. 植物检疫,29(4):15.
- CHAI H N, DU Y Z, ZHAI B P, 2012. Characterization of the complete mitochondrial genomes of *Cnaphalocrocis medinalis* and *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). International Journal of Biological Sciences, 8(4): 561.
- DANAYE-TOUS A H, JAFARI S, HEIDARY-ALIZADEH B, FARAZMAND H, 2022. Efficacy of nanocapsules loaded with Ectomyelois ceratoniae (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) sex pheromone as evaluated in wind tunnel and field trapping experiments. Journal of Plant Diseases and Protection, 129(4): 853-860,
- EXCOFFIER L, LISCHER H E, 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3): 564-567.
- FOLMER O, BLACK M, HOEH W, LUTZ R, VIRJENHOEK R, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial crs for amplification of mitochondrial cytochrome coxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5): 294–299.
- HACHED W, SAHRAOUI H, BLEL A, KAOUTHAR L G, 2021. Biological control of *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) using the egg parasitoid *Trichogramma cacoeciae* Marchal (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in a Tunisian citrus orchard. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 9(3): 98-104.
- HEYDARI M, IZADI H, 2014. Effects of seasonal acclimation on cold tolerance and biochemical status of the carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* Zeller, last instar larvae. *Bulletin of Entomological Research*, 104(5): 592-600.

- KUMAR S, STECHER G, TAMURA K, 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7): 1870–1874.
- LEIGH J W, BRYANT D, 2015. POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9): 1110–1116.
- LIU Q Y, JIANG X H, HOU X H, YANG H, CHEN W, 2018. The mitochondrial genome of *Ephestia elutella* (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae). *Mitochondrial DNA Part B*, 3 (1): 189–190.
- MA L, JI Y J, ZHANG D X, 2015. Statistical measures of genetic differentiation of populations: rationales, history and current states. *Current Zoology*, 61(5): 886–897.
- MAMAY M, 2018. Important parameters in mechanical management of carob moth [*Apomyelois* (= ectomyelois) ceratoniae Zeller (lep.: pyralidae)] in pomegranate orchards: determination of overwintering population density and infestation rate. *Fresenius Environmental Bulletin*, 27(12): 9542–9548.
- MARSBERG T, HILL M P, MOORE S D, TIMM A E, 2015. DNA-based identification of Lepidoptera associated with citrus in South Africa. *African Entomology*, 23(1): 165–171.
- NAY J E, PERRING T M, 2009. Effect of center cut strand thinning on fruit abscission and *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae) infestation in California date gardens. *Journal of Economic Entomology*, 102(3): 948–953.
- PEAKALL R, SMOUSE P E, 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6(1): 288–295.
- PRENTIS P J, WILSON J R, DORMONTT E E, RICHARD-SON D M, LOWE A J, 2008. Adaptive evolution in invasive species. *Trends in Plant Science*, 13(6): 288–294.
- ROZAS J, FERRER-MATA A, SÁNCHEZ-DELBARRIO J, GUIRAO-RICO S, LIBRADO P, RAMOS-ONSINS S E, SÁNCHEZ-GRACIA A, 2017. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology* and Evolution, 34(12): 3299–3302.
- SAITOU N, NEI M, 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biol*ogy and Evolution, 4(4): 406-425.
- SEDGHIANI S, RABOUDI F, BOUKTILA D, MAKNI H, MAKNI M, 2017. A practical molecular diagnostic tool of the date moth *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae) in Tunisia. *Journal of the Entomological Research Society*, 19(1): 81–90.