

亚洲玉米螟不同地理种群基于 COI 基因序列初步分析

黄丽莉^{1,2} 阙海勇² 陈超¹ 匡先钊¹ 薛芳森^{1*}

(1. 江西农业大学昆虫研究所 南昌 330045; 2. 江西出入境检验检疫局 南昌 330002)

摘要 本研究通过对我国亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Guenée) 6 个地理种群的线粒体 DNA COI 基因进行测序, 运用分子进化遗传分析软件 MEGA5 对序列进行对比和同源性分析, 并建立系统发育关系。结果表明, COI 基因在 6 个地理种群中进化具有一定的差异, 平均遗传距离为 0.013; 进化树显示, 亚洲玉米螟的三亚种群、广州种群与南昌种群聚为一支, 然后与泰安种群聚为一支, 再与哈尔滨种群聚为一支; 而廊坊种群另聚成一支。遗传分歧度与系统发育进化关系均表明不同地理种群的遗传分化与地理距离之间具有一定的相关性。

关键词 亚洲玉米螟, mtDNA-COI, 地理种群, 遗传分化

Variation of mtDNA COI sequences in different geographic populations of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*

HUANG Li-Li^{1, 2} QUE Hai-Yong² CHEN Chao¹ KUANG Xian-Ju¹ XUE Fang-Sen^{1*}

(1. Institute of Entomology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;

2. Jiangxi Entry-Exit in Spection and Quarantine Bureau, Nanchang 330002, China)

Abstract The mitochondrial DNA (mtDNA) cytochrome oxidase subunit I (COI) of 6 geo-populations of *Ostrinia furnacalis* (Guenée) was sequenced. The identity and variation of the resultant sequences and their phylogenic relationships were established by Mega 5. The results show that there are some differences in COI sequences among different geo-populations of *O. furnacalis* and that the average evolutionary divergence between populations is 0.012. Molecular phylogeny showed that the Sanyan, Guangzhou and Nanchang populations formed one branch, and the Taian, Haerbin and Langfang populations formed separate branches. The results of evolutionary divergence and molecular phylogeny suggest that the separation of different geo-populations of *O. furnacalis* is, at least to some extent, relative to geographic distance.

Key words *Ostrinia furnacalis*, mtDNA-COI, geo-population, genetic differentiation

亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Guenée) 属于鳞翅目 Lepidoptera, 草螟科 Crambidae, 秆野螟属 *Ostrinia*, 在国内从南到北均有分布, 是玉米上常发性的重要害虫。具有广泛地理分布的亚洲玉米螟由于所栖息地气候条件的不同 (例如不同地理纬度光周期和温度的季节变化、有效生长季节、冬季的持续期和冷冻程度不同), 导致其生活史和生物学特性在不同纬度发生了相应的改变。研究表明该虫的年发生代数自北向南逐渐增加 (刘宁等, 2005); 雌雄蛹重及成虫体长、后足腿节长和前翅

长均随纬度的升高而逐渐减小 (涂小云等, 2011); 临界光周期自北向南逐渐缩短 (杜正文和蔡蔚琦, 1964; 弓惠芬等, 1984; 鲁新等, 1995); 越冬幼虫复苏后的发育历期随纬度的升高而延长 (马瑞等, 2008); 幼虫的抗寒力随纬度的升高而增强; 滞育和非滞育幼虫的过冷却点和结冰点均随种群分布的地理经纬度的升高而降低 (刘宁等, 2005)。这些表现型的地理变异也反映了亚洲玉米螟不同地理种群存在遗传分化。目前已有许多研究尝试从遗传分化的分子特性对亚洲玉米螟地理种群进行

* 通讯作者, E-mail: xue_fangsen@ hotmail. com

收稿日期: 2012-02-07, 接受日期: 2012-04-24

遗传差异分析 (Wang *et al.* ,1995; 孙姗等,2000)。线粒体 DNA (mtDNA) 作为分子遗传标记已成为分子系统学研究中很好的方法 (Miya *et al.* ,2003), 线粒体细胞色素氧化酶第 1 亚基 (mtDNA COI) 被认为是动物界中最合适的 DNA 条形码标准基因 (Hebert *et al.* ,2003a, 2003b; 彭居俐等,2008)。COI 基因包含丰富的遗传信息, 相对保守又能保证足够变异, 进化速率适中, 可作为种属系统进化研究的良好标记, 目前已广泛应用于昆虫亲缘关系较近的种、种下分类单元以及地理种群之间 (褚栋等,2005; 王乃馨等,2008; 梁秋英,2009)。杨瑞生等 (2008) 通过分析 4 个地理种群亚洲玉米螟的 COII 基因分析认为其遗传进化与地理位置具有一定的相关性。而李菁等 (2010) 基于线粒体 DNA COII 基因对亚洲玉米螟中国不同地理种群遗传分

化及基因流的分析结果表明, 各地理种群的遗传距离与地理距离间不具有显著的相关性。本研究拟基于线粒体 DNA COI 基因序列对 6 个地理种群的亚洲玉米螟进行分析, 以期揭示该虫地理种群间的遗传分化和内在联系提供证据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

玉米螟实验用种群分别于 2011 年采自海南三亚、广东广州、江西南昌、山东泰安、河北廊坊以及黑龙江哈尔滨的玉米地 (表 1)。采集的虫源置于 28℃、光周期 L:D = 18:6 的光照培养箱中用人工饲料连续喂养 2 代后, 将大龄幼虫浸入盛有无水乙醇的塑料试管中, 置于 -20℃ 冰箱保存, 供试验用。

表 1 供试亚洲玉米螟的地理种群信息
Table 1 Data of the geographic populations of *Ostrinia furnacalis*

物种 Species	采集地点代号 Code name	采集地点 Locality	经纬度 Longitude and latitude	采集时间 Collection date	采集数量 No. of collection
亚洲玉米螟 <i>O. furnacalis</i>	HN-SY	海南三亚	18. 8°N 109. 2°E	2010. 04	15
	GD-GZ	广东广州	23. 13°N 113. 27°E	2010. 04	15
	JX-NC	江西南昌	28. 8°N 115. 9°E	2010. 04	15
	SD-TA	山东泰安	36. 19° N 117. 09° E	2010. 04	15
	HB-LF	河北廊坊	39. 53° N 116. 68° E	2010. 04	15
	HLJ-HEB	黑龙江 哈尔滨	44. 93° N 127. 17°E	2010. 04	15
欧洲玉米螟 <i>O. nubilalis</i>	America	美国		GenBank 登录号 :DQ204915. 1	
麻螟 <i>O. zealis</i>	China	中国		GenBank 登录号 :EU128658. 1	

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取 取玉米螟幼虫 1 头,应用昆虫组织 DNA 小量提取试剂盒 (OMEGA BIOTEK) 提取基因组 DNA (具体提取过程按照试剂盒说明书步骤进行操作)。提取的 DNA 样品取 2 μL 通过

1.0% 琼脂糖凝胶电泳来检测提取质量,检测合格后保存于 -20℃ 冰箱备用。

1.2.2 线粒体基因 PCR 扩增 PCR 扩增反应在 GeneAmp ABI 9700 DNA 扩增仪上进行,扩增反应总体积为 25 μL 其中含有 10 × PCR Buffer (Mg²⁺

plus) 2.5 μ L, dNTPs 2.0 μ L (2.5 mmol/L), 正/反向引物各 1.0 μ L (10 μ mol/L), 模板 DNA 1.0 μ L, 0.5 U TaKaRa *Taq* DNA 聚合酶, ddH₂O 17.5 μ L。PCR 反应程序设计为: 94℃ 预变性 3 min, (94℃ 30 s, T_m 退火 1 min, 72℃ 延伸 1.5 min) $\times$ 35 循环, 72℃ 延伸 10 min。反应结束后, 取 2 μ L PCR 产物于 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。电泳检测结果在凝胶成像系统下观察并拍照记录。

1.2.3 PCR 产物纯化与测序 经电泳检测确认成功扩增出目标片段后, PCR 产物采用 Sanprep 柱式 DNA 胶回收试剂盒(上海生工)进行纯化(具体纯化过程按照试剂盒说明书步骤进行操作), 纯化产物委托上海生工生物技术有限公司进行测序。测序实行正反链双向测序以提高所得序列的精确度。

1.2.4 序列分析方法 采用分子进化遗传分析软件 MEGA5 对 DNA 序列进行序列比对及同源性分析; 采用 Mega5 对序列进行系统发育分析, 计算所得序列的碱基组成, 物种间遗传距离、恒定位点(constant site), 变异位点(variation site)、简约信息位点(pasimony informative site)、单线突变位点(singleton site)、转换碱基对(transitional pairs)、颠换碱基对数(transversional pairs)。应用邻接法(NJ)、最小进化法(ME)和最大简约法(MP)等不

同建树方法推定亚洲玉米螟不同地理种群的分子系统进化树。

2 结果与分析

2.1 亚洲玉米螟 mtDNA COI 基因的序列特征分析

以总 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 从所有样品中均得到 1 条特异 PCR 产物, 且 3 次重复试验均得到单一条带, 经多重序列比对、整理, 截去两端测序引物及测序误差较大的区段, 得到序列信息准确的片段 1 067 bp (图 1)。测序结果在 NCBI 中用 BLAST 进行相似性检索, 其匹配的程度很好, 确认实验测得的序列为目的片段, 检索结果证明扩增和测序结果是准确和可靠的。

序列组成分析结果显示, 6 个亚洲玉米螟种群 mtDNA COI 基因序列平均碱基组成为: A: 31.9%、T: 39.9%、C: 14.7%、G: 13.5%, A + T 含量为 71.8%, 表现出明显的 A/T 碱基偏向性。

对 6 个地理种群的 COI 序列进行碱基对位排序分析, 共检测到 1 043 个保守位点, 34 个变异位点(表 1), 6 个简约信息位点, 28 个自裔位点。序列碱基转换 13 对, 没有颠换位点。结果表明, 亚洲玉米螟不同地理种群之间存在一定的遗传差异。

表 2 亚洲玉米螟不同地理种群间 mtDNA COI 基因序列突变位点统计
Table 2 Mutant sites of mtDNA COI from different populations of *Ostrinia furnacalis*

碱基替换位置 Site of base pair substitution																																					
2 4	2 7	9 9	1	1	1	2	2	2	2	2	3	4	4	5	6	6	6	6	7	7	7	8	8	8	8	8	9	9	9	9	9	9	1				
			0	1	8	0	1	1	6	7	7	3	8	0	5	7	9	9	9	1	7	8	0	0	1	8	9	0	2	5	6	7	8	0			
			2	4	1	4	6	7	7	3	5	5	9	7	1	2	3	9	7	7	3	3	4	0	8	4	9	1	1	3	9	7	6				
1	T	A	C	T	T	C	G	A	C	A	C	A	C	T	C	A	C	T	C	T	T	C	A	T	C	A	C	G	C	T	A	T	A	C			
2												G												A													
3												G												T													
4						T						G						T	G												T						
5	C		T	C	C	T	A	G	T	G	T		T	C	T		T	C		C	C	T	G	C	T	G	T	A	T	C	G	C	G	T			
6						T	A						G						T												A						T

1. 三亚种群 Sanya population; 2. 广州种群 Guangzhou population; 3. 南昌种群 Nanchang population; 4. 泰安种群 Taian population; 5. 廊坊种群 Langfang population; 6. 哈尔滨种群 Haerbin population.

2.2 亚洲玉米螟 mtDNA COI 基因的序列差异分析

2.2.1 遗传距离分析 采用 Mega 5 软件基于最

大复合概似法(maximum composite likelihood, MCL)模型和 Kimura-2-Parameter(K2P)双参数模型计算种间遗传距离(表 2), 结果表明, 外群与不



图 1 COI 基因 PCR 扩增电泳检测
(Marker:200 bp DNA ladder)

Fig.1 PCR detection of COI gene

同地理种群之间的进化分歧最大,为 0.015 ~ 0.025;亚洲玉米螟 6 个地理种群亚洲玉米螟的遗传距离在 0.001 ~ 0.019 之间,平均遗传距离为 0.012。其中廊坊种群与其他种群的分歧最大,为 0.017 ~ 0.019;其他种群间的进化分歧较小,以广州与三亚种群分歧最小为 0.002。

2.2.2 系统发育树的构建 采用 Mega5 软件基于用邻接法(NJ)、最小进化法(ME)和最大简约法(MP)等不同建树方法构建不同地理种群的分子系统发育树(图 2),系统树各分支的置信度由 1 000 次自举法(bootstrap)重复检测。从图 2 中可看出不同方法构建的系统发育树基本相似。共两大分支,其中廊坊种群为一支,其他种群聚为一支,其中三亚、广州与南昌聚为一支,然后与泰安聚为一支,再与哈尔滨聚为一支,结果表明,其进化与地理距离有一定的关系。

表 3 亚洲玉米螟不同地理种群基于
COI 序列的遗传距离

Table 3 Genetic distance of different populations of
Ostrinia furnacalis based on COI sequences

	1	2	3	4	5	6	7
1							
2	0.001						
3	0.002	0.002					
4	0.003	0.003	0.003				
5	0.018	0.018	0.019	0.017			
6	0.003	0.002	0.004	0.002	0.015		
7	0.016	0.016	0.018	0.016	0.002	0.015	
8	0.024	0.025	0.024	0.023	0.018	0.023	0.019

1. 三亚种群 Sanya population; 2. 广州种群 Guangzhou population; 3. 南昌种群 Nanchang population; 4. 泰安种群 Taian population 5. 廊坊种群 Langfang population; 6. 哈尔滨种群 Haerbin population; 7. 欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis*; 8. 麻螟 *O. zealis*.

3 讨论

自 Hebert 等(2003a, 2003b)提出利用线粒体 COI 这一特定基因的特定区段对所有生物进行编码分类以来,GenBank 提交的 COI 序列数迅速增长(Blaxter, 2003)。Hebert 等(2003b)利用鳞翅目的序列数据分析结果表明,同属各种 COI 序列的平均差异程度是 11.3%,本研究对亚洲玉米螟 6 个地理种群基于 COI 基因的分析结果表明种群间平均遗传距离为 0.012,大大低于鳞翅目同属各种的平均差异程度,这与种内差异小于种间差异一致。系统发育树也表明其他地理种群的进化与地理距离存在一定的相关性。但是利用线粒体 COI 基因部分 DNA 序列多大的序列分歧来确定不同地理种群间是否存在差异目前尚无定论,因

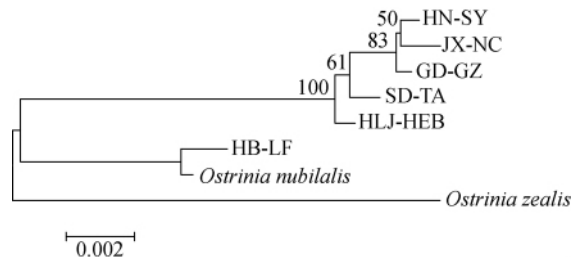


图 2 基于 mtDNA COI 基因序列构建的亚洲玉米螟 6 个地理种群的分子系统发育树

Fig.2 Molecular phylogenetic tree of six geographic population of *Ostrinia furnacalis*
based on mtDNA COI gene sequence

此在下一步的研究中应采用多种不同的分子标记的方法进行进一步验证。奇怪的是,廊坊种群与其他种群的遗传距离相差甚远,并在系统发育树上与欧洲玉米螟聚成一支、并与麻螟遗传距离相对其他地理种群差异更小,为什么如此目前还找不到合适的解释。不过我们在比较亚洲玉米螟不同地理种群在不同温度下幼虫的发育历期时发现,廊坊种群与其他种群显示了相对大的差异(未发表),这是否反映了廊坊种群在系统发育过程中经历了特殊的事件,非常值得进一步研究。

参考文献(References)

- Blaxter M, 2003. Molecular systematics: counting angels with DNA. *Nature*, 421:122—124.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR, 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 270 (1512):313—321.
- Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR, 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 270 (Suppl.):S96—S99.
- Miya M, Takeshima H, Endo H, Ishiguro NB, Inoue JG, Mukai T, Satoh TP, Yamaguchi M, Kawaguchi A, Mabuchi K, Shirai SM, Nishida M, 2003. Major patterns of higher teleostean phylogenies: A new perspective based on 100 complete mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 26:121—138.
- Wang RJ, Yan FM, Li SG, Li SW, 1995. Allozyme differentiation among nine populations of the corn borer in China. *Biochem. Gen.*, 33 (11/12):413—420.
- 褚栋, 张友军, 丛斌, 徐宝云, 吴青君, 朱国仁, 2005. 烟粉虱不同地理种群的 mtDNA COI 基因序列分析及其系统发育. *中国农业科学*, 38 (1):76—85.
- 杜正文, 蔡蔚琦, 1964. 玉米螟在江苏光周期的反应初报. *昆虫学报*, 13 (1):129—132.
- 弓惠芬, 陈霏, 王瑞, 连梅力, 夏志红, 阎毅, 1984. 光周期和温度对亚洲玉米螟滞育形成的影响. *昆虫学报*, 27 (3):280—286.
- 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.
- 梁秋英, 2009. 基于 COI 基因序列的九种真蜉属昆虫的分子系统学研究. *昆虫分类学报*, 31 (2):105—144.
- 刘宁, 文丽萍, 何康来, 王振营, 赵廷昌, 2005. 不同地理种群亚洲玉米螟抗寒力研究. *植物保护学报*, 32 (2):163—168.
- 鲁新, 李建平, 王蕴生, 1995. 亚洲玉米螟化性类型的初步研究. *玉米科学*, 3 (1):75—78.
- 马瑞, 钱海涛, 董辉, 夏新, 丛斌, 2008. 不同地理种群亚洲玉米螟越冬幼虫复苏后的发育历期研究. *湖北农业科学*, 47 (5):541—543.
- 彭居刚, 王绪桢, 何舜平, 2008. DNA 条形码技术的研究进展及其应用. *水生生物学报*, 32 (6):916—919.
- 孙姗, 徐茂磊, 王戎疆, 李绍文, 2000. RAPD 方法用于亚洲玉米螟地理种群分化的研究. *昆虫学报*, 43 (1):103—106.
- 涂小云, 夏勤雯, 陈超, 陈元生, 匡先钜, 薛芳森, 2011. 亚洲玉米螟体重和体型的地理变异. *昆虫学报*, 54 (2):143—148.
- 王乃馨, 封霞, 蒋国芳, 方宁, 轩文娟, 2008. 基于线粒体基因 Cytb 和 COI 的蝗科中五亚科分子系统发育关系分析(直翅目:蝗总科). *昆虫学报*, 51 (1):1187—1195.
- 杨瑞生, 王振营, 何康来, 白树雄, 2008. 秆野螟属部分种的线粒体 COII 基因序列分析及其分子系统学(鳞翅目:草螟科). *昆虫学报*, 51 (2):182—189.