

光对棉铃虫和烟青虫杂交的影响*

闫 硕^{1,2**} 李慧婷¹ 朱家林^{1,3} 刘彦君¹
张 璟¹ 张青文¹ 刘小侠^{1***}

(1. 中国农业大学昆虫系, 北京 100193; 2. 全国农业技术推广服务中心, 北京 100125;

3. 北京出入境检验检疫局, 北京 100026)

摘 要 【目的】 力求建立一种准确鉴定室内棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner)、烟青虫 *H. assulta* (Guenée) 及其杂交种的分子技术, 探讨棉铃虫和烟青虫杂交的可能。【方法】 室内暗期设置 0.5 lx 黑光灯和白炽灯, 测定不同配对模式下 3 日龄处女棉铃虫和烟青虫的杂交率; 筛选可区分室内建立的棉铃虫、烟青虫及杂交种家族的微卫星位点; 于架设有黑光灯的温室内释放棉铃虫和烟青虫混合种群, 利用微卫星分子标记技术检测子代微卫星位点大小。【结果】 两种蛾类在任何一种配对模式下均可杂交, 混合种群处理杂交率为 2.92%, 且均为烟青虫雌蛾与棉铃虫雄蛾配对交配; 黑光灯、白炽灯和黑暗条件下杂交率无显著性差异; 筛选出的 *HarSSR1*、*HarSSR9* 和 *HarSSR10* 在两种蛾类上的等位基因片段大小不一样; 两年温室实验共鉴定 360 头子代, 混合种群中未检测到杂交后代。【结论】 交配笼中棉铃虫和烟青虫能进行种间杂交, 弱光不能提高二者杂交率; 混合种群处理只发现一种杂交配对模式, 说明了棉铃虫雄蛾的交配竞争能力更强; 成功利用微卫星分子标记技术鉴定室内建立的棉铃虫、烟青虫及杂种家族, 提供了一种简单准确的分子鉴定手段; 两年温室实验未检测到杂交种, 说明 2 种蛾类之间存在着交配前生殖隔离机制。

关键词 光强度, 黑光灯, 交配行为, 微卫星分子标记, 杂交

The extent of hybridization between *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *H. assulta* (Guenée) and a molecular method for identifying these species and their hybrids

YAN Shuo^{1,2**} LI Hui-Ting¹ ZHU Jia-Lin^{1,3} LIU Yan-Jun¹ ZHANG Jing¹
ZHANG Qing-Wen¹ LIU Xiao-Xia^{1***}

(1. Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 2. National Agricultural Technology Extension and Service Center, Beijing 100125, China; 3. Beijing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Beijing 100026, China)

Abstract [Objectives] To establish a molecular technique that can reliably distinguish the cotton bollworm, the tobacco budworm, and hybrids between these species, to determine the effect of different kinds of light on hybridization, and the extent of hybridization in a mixed population under greenhouse conditions. [Methods] Hybridization rates under all potential kinds of pairings between 3 day-old virgin cotton bollworm and tobacco budworm adults were recorded under a 0.5 lx black lamp, an incandescent lamp, and complete darkness (control). Microsatellite loci that could reliably distinguish cotton bollworms, tobacco budworms, and their hybrids, were identified and used to identify the resultant progeny. A mixed population of cotton bollworm and tobacco budworm adults were released in a greenhouse and their offspring screened using the previously identified microsatellite markers. [Results] Hybridization could result from all kinds of forced pairings. However, in mixed populations, the proportion of hybrids was just 2.92%, and only one kind of pairing (male cotton bollworm × female tobacco budworm) was observed. There was no significant difference in hybridization rates between the black lamp, incandescent lamp, and dark, treatments. The sizes of the microsatellite loci *HarSSR1*, *HarSSR9*, and *HarSSR10*, differ between the two species.

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金 (31371943)

**第一作者 First author, E-mail: yanshuo2011@foxmail.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: liuxiaoxia611@cau.edu.cn

收稿日期 Received: 2016-07-29, 接受日期 Accepted: 2016-08-09

No hybrids were identified among 360 offspring screened during two years research on a mixed, greenhouse population.

[Conclusion] Hybridization between the cotton bollworm and tobacco budworm can occur when individuals are not free to choose mates but low intensity light does not promote hybridization. Only one kind of pairing was observed in mixed populations, suggesting that male cotton bollworms are competitively superior to male tobacco budworms in competition for mates. The cotton bollworm, tobacco budworm, and hybrids between these species, could be reliably distinguished with microsatellite markers, which provide a simple and accurate molecular identification method. Hybrids were not identified during two years study of a mixed, greenhouse population, indicating that there is premating reproductive isolation between the two species.

Key words light intensity, black lamp, mating behavior, microsatellite marker technology, hybridization

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 和烟青虫 *H. assulta* (Guenée) 同隶属于鳞翅目夜蛾科, 广泛分布于世界各地, 是我国农作物上的重要害虫, 特别是棉铃虫危害严重, 曾于 1992 年在我国南北棉区大暴发, 给我国农业生产带来了巨大的经济损失 (张青文, 2007)。由于夜蛾具有趋光性 (魏国树等, 2000; 靖湘峰等, 2005; 闫硕等, 2012), 灯光诱杀技术已成为田间防治的一种重要手段 (盛承发等, 2003; Nowinszky *et al.*, 2009; Nowinszky and Puskas, 2011), 同时, 大量实验已证实光对蛾类交配行为具有重要意义 (Kamimura and Tatsuki, 1994; 闫硕等, 2014; Li *et al.*, 2015)。本实验研究光对棉铃虫和烟青虫杂交的影响, 旨在探讨弱光是否有利于蛾类杂交, 探讨自然界中棉铃虫与烟青虫杂交的可能。

光是自然界一种重要的环境因子, 参与调控着昆虫的交配行为。许多昼行性昆虫在光环境下才能完成交配 (Grossfield, 1971; Sakai *et al.*, 1997), 而夜行性蛾类主要借助性信息素完成交配前的识别, 强光或持续光照可以明显抑制蛾类的求偶行为和性信息素的合成 (Raina *et al.*, 1991; Kawazu *et al.*, 2011)。棉铃虫和烟青虫室内可以杂交生成可育后代 (Wang and Dong, 2001), 但二者性信息素组分不同 (Wang *et al.*, 2005), 给交配前识别造成了一定障碍, 田间灯光诱能提高二者相遇的机率, 之前的研究表明弱光可以促进二者的求偶行为, 促进其快速完成种内交配 (闫硕等, 2014; Li *et al.*, 2015), 这些研究结果为我们探讨光对杂交影响提供了一个良好的基础。微卫星分子标记技术 (SSR) 因其高

度多态性和共显性遗传的特点, 广泛地应用于亲子鉴定领域 (Zhang and Hewitt, 2003; 孙亚光和李火根, 2007; 孙洁茹等, 2011; Yan *et al.*, 2013), 棉铃虫微卫星位点已有报道 (Ji *et al.*, 2003, 2005; Scott *et al.*, 2004), 为我们开展棉铃虫、烟青虫及其杂交种的分子鉴定提供了基础。

光环境对蛾类交配具有重要意义, 但光环境是否会影响蛾类杂交尚不明确, 光的吸引能否给棉铃虫和烟青虫提供一个充分接触的机会, 从而提高杂交率是一个值得探讨的问题。本实验力求建立一种准确鉴定室内饲养的棉铃虫、烟青虫及其杂交种的分子技术, 探讨光对棉铃虫和烟青虫杂交的影响, 明确二者是否存在交配前生殖隔离。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

棉铃虫和烟青虫在中国农业大学 IPM 实验室内长期饲养, 幼虫分别采自河北省保定市棉田和河南省许昌市烟田。饲养温度 (26 ± 1) °C, 光周期 16L : 8D, 相对湿度 $75\% \pm 10\%$ 。幼虫用人工饲料饲养 (Wu and Gong, 1997), 初孵幼虫群体饲养, 3 龄后单头饲养以防自相残杀, 蛹期分雌雄, 分别置于养虫笼 ($20 \text{ cm} \times 25 \text{ cm} \times 30 \text{ cm}$) 中等待羽化, 当日羽化蛾记为 1 日龄。成虫饲喂 10% 蜂蜜水。杂交种的饲养方法相同。

1.2 弱光对于棉铃虫和烟青虫杂交的影响

光强和光源 : 参照以往的研究方法 (闫硕等, 2014; Li *et al.*, 2015), 交配实验在光照箱 ($60 \text{ cm} \times 40 \text{ cm} \times 60 \text{ cm}$) 中进行, 设置黑暗、(0.5 ± 0.1) lx 黑光灯、(0.5 ± 0.1) lx 白炽灯环境, 光源下隔毛

玻璃，光照箱四壁贴上白纸使光照均匀散开（Omkar and Pathak, 2006），通过照度计（TES1300A, TES Electrical Electronic Corp.）测量光照强度。

交配处理：多数蛾类在 2~3 日龄求偶活跃（Kou and Chow, 1987；Hou and Sheng, 2000；Ming *et al.*, 2007），本实验选择 3 日龄处女蛾为试验材料。处理 1：10 对棉铃虫雌雄蛾；处理 2：10 对烟青虫雌雄蛾；处理 3：10 对棉铃虫雌蛾和烟青虫雄蛾；处理 4：10 对烟青虫雌蛾和棉铃虫雄蛾；处理 5（混合种群处理）：5 对棉铃虫雌雄蛾和 5 对烟青虫雌雄蛾。进入暗期后，将交配笼（20 cm × 25 cm × 30 cm）放入光照箱内，每 15 min 观察一次，发现交配的试虫取出计数，

统计交配率。每个处理重复 8 次。

1.3 利用 SSR 分子标记技术鉴定棉铃虫、烟青虫及其杂交代

试虫的准备：处理 1：10 对棉铃虫雌雄蛾；处理 2：10 对烟青虫雌雄蛾；处理 3：10 对棉铃虫雌蛾和烟青虫雄蛾。在进入暗期后，将试虫放入交配笼中进行交配，收集卵并饲养杂交代。

SSR 位点的筛选：采用 CTAB 法（Doyle and Doyle, 1987）提取 3 个处理的亲本（共计 60 头）、处理 3 所获杂交种 3 龄幼虫（随机取 10 头）DNA，处理 1 和 2 子代用于后续试验。利用棉铃虫 15 个多态性较高的 SSR 位点引物（表 1）对 DNA 样本进行 PCR 扩增，经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测

表 1 棉铃虫 15 个微卫星位点的引物信息

Table 1 Characteristics of fifteen microsatellite loci in *Helicoverpa armigera*

位点 Locus	引物序列 Sequence (5'-3')	退火温度 Annealing temperature (°C)	长度 Size range (bp)	位点数 Number of alleles
<i>HarSSR1</i>	TAGGTGATTGTGGCTCAGTTTT CAAACCCATCAGCAAATGCAAC	58	228-288	20
<i>HarSSR2</i>	AACACCCATTGAAGTCCCATGAA TTCCTATGTTCACTGCTAGTT	52	156-171	6
<i>HarSSR3</i>	ATCTTTATGCTTTTAGCCGTTTA CAGTGGACTGCTATAGGCTGA	59	129-147	6
<i>HarSSR4</i>	TGTTACTTGGGTTTCCTGAATA ACCACCGACACGTGCCGACTTC	60	166-196	11
<i>HarSSR5</i>	GATAAGTTATTTTCGGTTTAGTATT AAGTACCTAATCCGTTTTTATTC	54	165-192	9
<i>HarSSR6</i>	TGTTGTTGCAGAGCTGCC TTCAGCAACACAACCGTACA	65	292-340	12
<i>HarSSR7</i>	AAGCAATAATTACCAGAAACAG GTTTATTCGTGTATTCATTAAATAG	55	80-176	10
<i>HarSSR8</i>	TTAGGTGATTGTGGCTCAGT ATTTAGCACATGCAGCAAA	65	232-286	18
<i>HarSSR9</i>	AGCTCCACAACCTCTTAACCTAC GCAAAGGATCACTGATATTAAC	62	189-261	21
<i>HarSSR10</i>	CAGGACATGCAATGATGAG TTTGATACTGAGTCTGATGTG	62	223-382	28
<i>HaC14</i>	TCCACACAGTTTGCATTATGA CGCCATAATCCTATTGATTC	51	161	—
<i>HaB60</i>	CACCACCTGACATAACGC AAGGAGCAGCAATTGCAAGC	51	162	—
<i>HaD47</i>	TCAAACACACATACTTGACTA TCCAGCAGTGGAATGCCA	51	140	—
<i>HaD25</i>	GCTGTGTATGGTAGACTTGT CGGATATAAATACTATACCTC	51	161	—
<i>HaC87</i>	ACGCGAGCACCAACTGTAA GAGACCAATAGCAGTAGTTC	53	118	—

后筛选出能同时应用于棉铃虫、烟青虫及其杂交种的引物。将筛选出的引物末端用荧光进行标记 (FAM、HEX 或 NED) (Yan *et al.*, 2013), 对棉铃虫、烟青虫及其杂交种 DNA 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (10 μ L): 6.65 μ L 的灭菌双蒸水, 各 0.2 μ L 的 15 μ mol/L 正反引物, 0.2 μ L 的 dNTP, 1.5 μ L 的 enzyme buffer, 0.25 μ L 的 Taq 酶 (2 U/ μ L), 1 μ L 的 DNA 样本。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 95 $^{\circ}$ C, 30 s, 50 $^{\circ}$ C, 30 s, 72 $^{\circ}$ C, 30 s, 33 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min。使用 GENESCAN400HD (ROX) 作为内标, 经毛细管电泳后在 ABI PRISM3100 自动测序仪上测序, 利用 GENESCAN3.7 软件获得 SSR 等位基因位点的大小。根据 SSR 位点的大小, 筛选出棉铃虫和烟青虫特有位点, 进而用于鉴定棉铃虫、烟青虫及其杂交种。

1.4 温室光环境下棉铃虫和烟青虫的自然杂交

温室设置: 温室实验在中国农业大学上庄试验站进行 (Yan *et al.*, 2015)。将温室用铁架和纱网改造为 6 m $\times$ 5 m 的 12 个小间, 室内种植烟草, 行距 1 m, 株距 0.3 m, 室内温度 25~28 $^{\circ}$ C, 湿度 60%~80%, 常规水肥管理, 不施农药。

试虫释放: 两年分别于 6 月初和 5 月底释放

蛹, 所用试虫为方法 1.3 中处理 1 和 2 的子代。处理 1: 100 对棉铃虫雌雄蛹+夜间无光照; 处理 2: 100 对烟青虫雌雄蛹+夜间无光照; 处理 3: 50 对棉铃虫雌雄蛹+50 对烟青虫雌雄蛹+夜间无光照; 处理 4: 50 对棉铃虫雌雄蛹+50 对烟青虫雌雄蛹+夜间黑光灯照射。每个处理重复 3 次。

种群数量调查及子代鉴定: 每代试虫羽化后自由交配繁殖。每代混合种群处理随机取 30 头幼虫 (10 头/温室 $\times$ 3 个温室) 用于分子鉴定, 确定是否产生杂交种。

1.5 数据分析

借助 SPSS16.0 软件完成, 采用 Tukey 多重比较和独立样本 *t*-检验方法进行, $P < 0.05$ 视为显著性差异。

2 结果与分析

2.1 弱光对棉铃虫和烟青虫杂交的影响

如图 1 所示, 棉铃虫和烟青虫在任何一种配对模式下均可杂交, 黑光灯和白炽灯都不能显著提高杂交率 (棉♀ $\times$ 棉♂: $F_{2,21}=0.157$, $P=0.856$; 烟♀ $\times$ 烟♂: $F_{2,21}=0.276$, $P=0.762$; 棉♀ $\times$ 烟♂: $F_{2,21}=0.440$, $P=0.650$; 烟♀ $\times$ 棉♂: $F_{2,21}=0.551$,

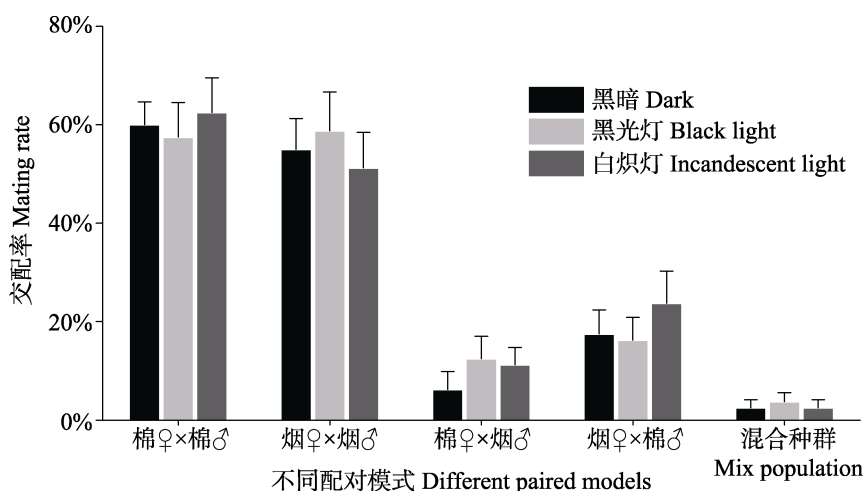


图 1 黑光灯和白炽灯对棉铃虫和烟青虫杂交的影响

Fig. 1 The effects of black light and incandescent light on the hybridization of cotton bollworm and tobacco budworm

棉♀ $\times$ 棉♂: Cotton bollworm female $\times$ male; 烟♀ $\times$ 烟♂: Tobacco budworm female $\times$ male; 棉♀ $\times$ 烟♂: Cotton bollworm female $\times$ tobacco budworm male; 烟♀ $\times$ 棉♂: Tobacco budworm female $\times$ cotton bollworm male; 混合种群 Mix population: Cotton bollworm female and male $\times$ tobacco budworm female and male.

$P=0.585$ ；混合种群： $F_{2,21}=0.179$ ， $P=0.837$ ）。烟青虫雌蛾与棉铃虫雄蛾的杂交率显著高于棉铃虫雌蛾与烟青虫雄蛾的杂交率（ $t=2.473$ ， $df=46$ ， $P=0.017$ ）。混合种群处理中共发现 7 对试虫种间杂交，杂交率为 2.92%，且均为烟青虫雌蛾与棉铃虫雄蛾配对交配。

2.2 利用 SSR 分子标记技术鉴定棉铃虫、烟青虫及其杂交代

通过 PCR 反应筛选出 *HarSSR1*、*HarSSR4*、*HarSSR6*、*HarSSR8*、*HarSSR9* 和 *HarSSR10* 位点能同时应用于棉铃虫、烟青虫及其杂交种（*HarSSR1*、*HarSSR8*、*HarSSR9* 和 *HarSSR10* 位点凝胶电泳结果如图 2 所示）。

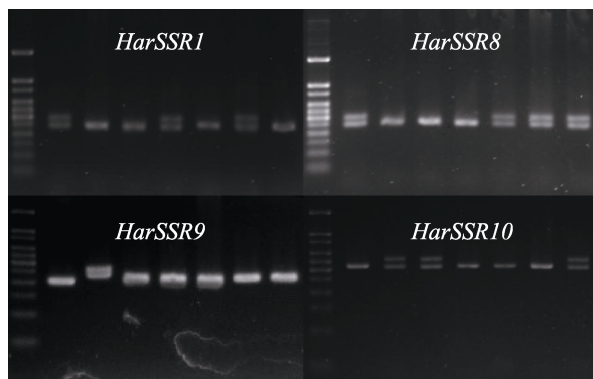


图 2 微卫星位点 PCR 扩增产物电泳图
Fig. 2 PCR amplification products electrophoretogram for microsatellite loci

将筛选出的引物末端用荧光进行标记后对 DNA 样本进行 PCR 扩增。经毛细管电泳后进行基因分型，结果显示：*HarSSR1*、*HarSSR9* 和 *HarSSR10* 在棉铃虫和烟青虫上的等位基因片段大小不一样（表 2），杂交种在 3 个位点上为杂合子，等位基因一半来自亲本棉铃虫，另一半来自亲本烟青虫，即 3 个位点可用于鉴定棉铃虫、烟青虫及杂交种。

表 2 棉铃虫和烟青虫的微卫星位点多态性
Table 2 The microsatellite polymorphism of cotton bollworm and tobacco budworm

位点 Locus	长度 Size range (bp)	
	棉铃虫 Cotton bollworm	烟青虫 Tobacco budworm
<i>HarSSR1</i>	254, 257, 260, 266, 268, 272	245, 247, 251, 263
<i>HarSSR9</i>	222, 226, 228, 230, 240	200, 202, 204, 206, 208
<i>HarSSR10</i>	279, 311, 317, 340	248, 299, 308, 350

2.3 温室光环境下棉铃虫和烟青虫的自然杂交

棉铃虫和烟青虫在温室中生长状况良好，在烟草上共繁殖 3 代，混合种群处理中每代幼虫高峰期随机取 30 头幼虫用于子代鉴定，两年共鉴定 360 头子代，在混合种群中未检测到杂交后代，但后代中棉铃虫个体数高于烟青虫（图 3）。

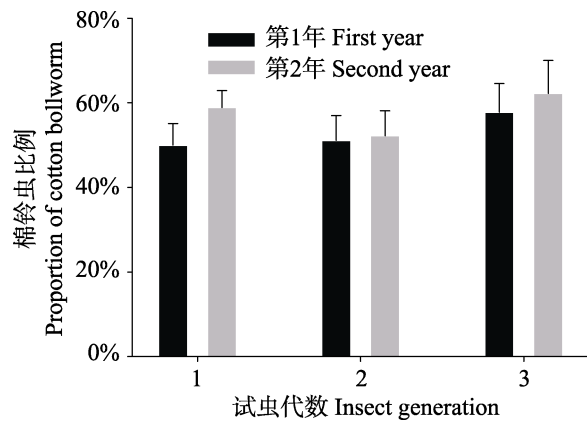


图 3 两年子代中棉铃虫比率
Fig. 3 Proportion of cotton bollworm among offsprings during two years

3 讨论

光环境对昆虫交配具有重要意义，昼行性昆虫果蝇在光照环境下交配率、交配持续时间等参数高于黑暗环境，且雄蝇受到更大影响（Sakai *et al.*, 1997），不同的光波段对交配也具有显著性影响，UV 光下交配率低（Sakai *et al.*, 2002）。对于夜行性昆虫来说不同，棉铃虫和烟青虫在 0.5 lx 弱光下雌蛾求偶行为较黑暗环境更加活跃，可以促进种内快速完成交配，而强光会抑制其求偶和交配行为（闫硕等，2014；Li *et al.*, 2015）。Yan 等（2014）的研究表明：棉铃虫雄蛾长波视觉基因夜晚表达量高于雌蛾，可能与雌雄蛾交配前识别相关，也提供了弱光可能促进交配的分子基础。夜蛾的趋光性导致田间黑光灯诱蛾的广泛使用（魏国树等，2000；Sambaraju and Phillips, 2008；闫硕等，2012），本实验设置 0.5 lx 的黑光灯和白炽灯，探讨弱光是否可以促进棉铃虫和烟青虫的种间杂交。结果表明：（1）棉铃虫雌蛾和烟青虫雄蛾、棉铃虫雄蛾和烟青虫

雌蛾在交配笼中配对后, 会发生种间杂交, 杂交率较低, 且黑光灯和白炽灯不能提高杂交率。(2) 烟青虫雌蛾与棉铃虫雄蛾的杂交率高于棉铃虫雌蛾与烟青虫雄蛾, 混合种群处理也发生了种间杂交, 且均为烟青虫雌蛾和棉铃虫雄蛾配对交配, 二者均说明了棉铃虫雄蛾比烟青虫雄蛾交配竞争能力强。而 Wang 和 Dong (2001) 的研究表明: 杂交组合雌性烟青虫与雄性棉铃虫、雌性棉铃虫与雄性烟青虫, 雌虫杂交率分别为 7.14% 和 8.82%。蛾类自身生理状态和所处环境都会对交配行为产生影响 (Hou and Sheng, 2000; 鲁玉杰等, 2002; Li *et al.*, 2005)。

本研究选择微卫星分子标记作为子代鉴定的方法, 共筛选出 *HarSSR1*、*HarSSR9* 和 *HarSSR10* 3 个微卫星位点可用于鉴定实验室建立的棉铃虫、烟青虫及杂交种家族, 杂交种等位基因一半来自亲本棉铃虫, 另一半来自亲本烟青虫。Yan 等 (2013) 借助 *HarSSR1*、*HarSSR4* 和 *HarSSR10* 微卫星位点进行了棉铃虫 13 个家族的亲子鉴定, 阐明了精子竞争格局。孙亚光和李火根 (2007) 借助 12 个微卫星位点对鹅掌楸进行了子代父本分析, 在 95% 的可信度确定 114 个子代的父本。本实验中由于亲本个体数较少, 微卫星多态性不高, 此微卫星引物只能用于鉴定本实验中建立的家族个体, 但为相关研究提供了一个较为简单和准确的鉴定方法。

鳞翅目雌雄蛾产生的性信息素对交配前的选择和种群隔离具有重要作用 (Lecomte *et al.*, 1998; Hillier and Vickers, 2004), 光环境对性信息素的合成、释放、识别都具有一定影响 (Raina *et al.*, 1991; Kamimura and Tatsuki, 1994; Liu *et al.*, 2004)。雌性产生的信息素对于交配前识别有着重要作用, 当棉铃虫雄蛾剪除触角后, 即雄蛾无法接收到雌蛾释放的性信息素后, 不能进行成功交配 (范伟民等, 2003)。棉铃虫和烟青虫性信息素的主要成分均为顺 11-十六碳烯醛 (Z11-16:Al) 和顺 9-十六碳烯醛 (Z9-16:Al), 前者比率为 100:2.1, 后者比率为 1 739:100 (Wang *et al.*, 2005)。棉铃虫和烟青虫对 Z11-16:Al 和 Z9-16:Al 以 97:3 和 7:

93 比例形成的混合物均有触角电位反应, 且二者之间没有显著性差异 (赵新成等, 2003), 但不同比例的混合物在田间诱蛾活性差异很大 (Kehat *et al.*, 1980)。棉铃虫和烟青虫性信息素组分比率的不同造成了交配前生殖隔离, 本实验中温室架设的黑光灯能提高棉铃虫和烟青虫相遇的机率, 给杂交提供了一个先决条件。两年温室实验模拟田间的实际生产模式, 试虫在烟草上繁殖 3 代, 在混合种群中未检测到杂交后代; 而在交配笼中 (混合种群处理) 我们获得了杂交代, 原因可能为: 温室中蛾类主要借助特异性的性信息素完成交配前识别, 造成杂交很难, 交配笼给蛾类提供了一个相对狭小的空间, 种群密度很大, 蛾类在高浓度的性信息素挥发物中容易错配杂交。有研究表明: 棉铃虫雌蛾在高浓度性信息素环境中求偶更加活跃, 寻找配偶方面表现得更加积极主动, 雄蛾则由于弥散在四周的性信息素而无所适从, 需要花更多的时间进行定位和辨别真伪 (范伟民和盛承发, 2000)。棉铃虫和烟青虫在烟田同区域、同时间发生 (花保祯等, 1996; 罗梅浩等, 2002), 但温室中没有检测到杂交种, 说明棉铃虫和烟青虫通过性信息素可以准确识别同类, 二者之间存在着交配前生殖隔离机制。

4 结论

在交配笼中, 棉铃虫和烟青虫能进行种间杂交, 黑光灯和白炽灯不能提高二者种间杂交率。混合种群处理只发现烟青虫雌蛾与棉铃虫雄蛾配对杂交, 说明棉铃虫雄蛾比烟青虫雄蛾交配竞争能力强。成功筛选出 *HarSSR1*、*HarSSR9* 和 *HarSSR10* 微卫星位点可用于鉴定实验室建立的棉铃虫、烟青虫及杂交种家族, 为相关研究提供了一种简单和准确的鉴定方法。两年温室实验中没有检测到杂交种, 说明棉铃虫和烟青虫之间存在着交配前生殖隔离机制。

参考文献 (References)

- Doyle JJ, Doyle JL, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19(1): 11–15.

- Fan WM, Sheng CF, 2000. Behavioral responses of *Helicoverpa armigera* moth to high sex pheromone concentration. *Acta Entomologica Sinica*, 43(1): 114–118. [范伟民, 盛承发, 2000. 棉铃虫成虫对高浓度性信息素的行为反应. 昆虫学报, 43(1): 114–118.]
- Fan WM, Sheng CF, Su JW, 2003. Electrophysiological and behavioral responses of both sexes of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) to sex pheromones. *Acta Entomologica Sinica*, 46(2): 138–143. [范伟民, 盛承发, 苏建伟, 2003. 棉铃虫成虫对性信息素的电生理和行为反应研究. 昆虫学报, 46(2): 138–143.]
- Grossfield J, 1971. Geographic distribution and light-dependent behavior in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(11): 2669–2673.
- Hillier NK, Vickers NJ, 2004. The role of heliothine hairpencil compounds in female *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) behavior and mate acceptance. *Chemical Senses*, 29(6): 499–511.
- Hou ML, Sheng CF, 2000. Calling behaviour of adult female *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lep., Noctuidae) of overwintering generation and effects of mating. *Journal of Applied Entomology*, 124(2): 71–75.
- Hua BZ, Yuan F, Yang CJ, Wang LG, Lei YX, Zhao SF, 1996. Occurrence and distribution of the oriental tobacco budworm *Helicoverpa assulta* (Guenée) and the cotton bollworm *H. armigera* (Hübner) in tobacco field of shanxi. *Acta Tabacaria Sinica*, 3(2): 8–13. [花保祯, 袁锋, 杨从军, 王利国, 雷耀先, 赵淑芳, 1996. 烟青虫和棉铃虫在陕西烟区的地理分布及其成因分析. 中国烟草学报, 3(2): 8–13.]
- Ji YJ, Wu YC, Zhang DX, 2005. Novel polymorphic microsatellite markers developed in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Science*, 12(5): 331–334.
- Ji YJ, Zhang DX, Hewitt GM, Kang L, Li DM, 2003. Polymorphic microsatellite loci for the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and some remarks on their isolation. *Molecular Ecology Notes*, 3(1): 102–104.
- Jing XF, Luo F, Zhu F, Huang QY, Lei CL, 2005. Effects of different light source and dark-adapted time on phototactic behavior cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). *Chinese Journal of Applied Ecology*, 16(3): 586–588. [靖湘峰, 罗峰, 朱芬, 黄求应, 雷朝亮, 2005. 不同光源和暗适应时间对棉铃虫蛾趋光行为的影响. 应用生态学报, 16(3): 586–588.]
- Kamimura M, Tatsuki S, 1994. Effects of photoperiodic changes on calling behavior and pheromone production in the oriental tobacco budworm moth, *Helicoverpa assulta* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Insect Physiology*, 40(8): 731–734.
- Kawazu K, Adati T, Tatsuki S, 2011. The effect of photoregime on the calling behavior of the rice leaf folder moth, *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Japan Agricultural Research Quarterly*, 45(2): 197–202.
- Kehat M, Gothilf S, Dunkelblum E, Greenberg S, 1980. Field evaluation of female sex pheromone components of the bollworm, *Heliothis armigera*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 27(2): 188–193.
- Kou R, Chow YS, 1987. Calling behavior of the cotton bollworm, *Heliothis armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 80(4): 490–493.
- Lecomte C, Thibout E, Pierre D, Auger J, 1998. Transfer, perception and activity of male pheromone of *Acrolepiopsis assectella* with special reference to conspecific male sexual inhibition. *Journal of Chemical Ecology*, 24(4): 655–671.
- Li H, Yan S, Li Z, Zhang Q, Liu X, 2015. Dim light during scotophase enhances sexual behavior of the oriental tobacco budworm *Helicoverpa assulta* (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist*, 98(2): 690–696.
- Li Z, Li D, Xie B, Ji R, Cui J, 2005. Effect of body size and larval experience on mate preference in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lep., Noctuidae). *Journal of Applied Entomology*, 129(9/10): 574–579.
- Liu Y, Kono Y, Honda H, 2004. Effects of light intensity on reproductive behavior of male dark winged fungus gnat, *Bradysia paupera* (Diptera: Sciaridae). *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*, 48(2): 151–154.
- Lu YJ, Zhang XX, Zhai BP, 2002. The effect of temperature and photoperiod on titer and ratio of the female sex pheromone components of *Helicoverpa armigera*. *Acta Ecologica Sinica*, 22(4): 566–570. [鲁玉杰, 张孝羲, 翟保平, 2002. 温度和光周期对棉铃虫雌性信息素成分的含量与比例的影响. 生态学报, 22(4): 566–570.]
- Luo MH, Guo XR, Zheng XJ, Chen Z, Ma JS, 2002. The niche and interspecific competition of oriental tobacco budworm and cotton bollworm in tobacco plants. *Acta Tabacaria Sinica*, 8(4): 34–37. [罗梅浩, 郭线茹, 郑晓军, 陈智, 马继盛, 2002. 烟青虫和棉铃虫在烟草上的生态位及其种间竞争. 中国烟草学报, 8(4): 34–37.]
- Ming QL, Yan YH, Wang CZ, 2007. Mechanisms of premating isolation between *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Helicoverpa assulta* (Guenée) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Insect Physiology*, 53(2): 170–178.
- Nowinszky L, Bürgés GY, Herczig B, Puskás J, 2009. Flying height of insects connected with moon phases used the light-trap catch data. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 44(1): 193–200.
- Nowinszky L, Puskas J, 2011. Light trapping of *Helicoverpa armigera* in India and Hungary in relation with the moon phases. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 81(2): 154–157.
- Omkar, Pathak S, 2006. Effects of different photoperiods and wavelengths of light on the life-history traits of an aphidophagous ladybird, *Coelophora saucia* (Mulsant). *Journal of Applied Entomology*, 130(1): 45–50.

- Raina AK, Davis JC, Stadelbacher EA, 1991. Sex-pheromone production and calling in *Helicoverpa zea* (Lepidoptera, Noctuidae): effect of temperature and light. *Environmental Entomology*, 20(5): 1451–1456.
- Sakai T, Isono K, Tomaru M, Fukatami A, Oguma Y, 2002. Light wavelength dependency of mating activity in the *Drosophila melanogaster* species subgroup. *Gene and Genetic Systems*, 77(3): 187–195.
- Sakai T, Isono K, Tomaru M, Oguma Y, 1997. Light-affected male following behavior is involved in light-dependent mating in *Drosophila melanogaster*. *Gene and Genetic Systems*, 72(5): 275–281.
- Sambaraju KR, Phillips TW, 2008. Responses of adult *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) to light and combinations of attractants and light. *Journal of Insect Behavior*, 21(5): 422–439.
- Scott KD, Lange CL, Scott LJ, Graham GC, 2004. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Molecular Ecology Notes*, 4(2): 204–205.
- Sheng CF, Sheng R, Wang HT, Xuan WJ, 2003. Correlation of lunar phase to the peak dates of light catches of two rice borer species. *Chinese Journal of Ecology*, 22(6): 121–123. [盛承发, 盛如, 王红托, 宣维健, 2003b. 两种稻螟灯下蛾峰日与月相的关系. *生态学杂志*, 22(6): 121–123.]
- Sun JR, Li Y, Yan S, Zhang QW, Xu HL, 2011. Microsatellite marker analysis of genetic diversity of *Cacopsylla chinensis* (Yang et Li) (Hemiptera: Psyllidae) populations in China. *Acta Entomologica Sinica*, 54(7): 820–827. [孙洁茹, 李燕, 闫硕, 张青文, 徐环李, 2011. 微卫星标记分析中国梨木虱种群的遗传多样性. *昆虫学报*, 54(7): 820–827.]
- Sun Y, Li H, 2007. The paternity analysis for open-pollination progenies of *Liriodendron* L. using SSR markers. *Chinese Bulletin of Botany*, 24(5): 590–596. [孙亚光, 李火根, 2007. 利用 SSR 分子标记对鹅掌楸自由授粉子代的父本分析. *植物学通报*, 24(5): 590–596.]
- Wang CZ, Dong JF, 2001. Interspecific hybridization of *Helicoverpa armigera* and *H. assulta* (Lepidoptera: Noctuidae). *Chinese Science Bulletin*, 46(6): 490–492.
- Wang HL, Zhao CH, Wang CZ, 2005. Comparative study of sex pheromone composition and biosynthesis in *Helicoverpa armigera*, *H. assulta* and their hybrid. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(6): 575–583.
- Wei GS, Zhang QW, Zhou MZ, Wu WG, 2000. Studies on the phototaxis of *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Acta Biophysica Sinica*, 16(1): 89–95. [魏国树, 张青文, 周明群, 吴卫国, 2000. 不同光波及光强度下棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)成虫的行为反应. *生物物理学报*, 16(1): 89–95.]
- Wu KJ, Gong PY, 1997. A new and practical artificial diet for the cotton bollworm. *Entomologia Sinica*, 4(3): 277–282.
- Yan S, Li H, Zhang J, Zhu J, Zhang Q, Liu X, 2013. Sperm storage and sperm competition in the *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 106(2): 708–715.
- Yan S, Li HT, Zhu WL, Zhu JL, Zhang QW, Liu XX, 2014. Effects of light on the sexual behavior of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 57(9): 1045–1050. [闫硕, 李慧婷, 朱威龙, 朱家林, 张青文, 刘小侠, 2014. 光强度对棉铃虫交配行为的影响. *昆虫学报*, 57(9): 1045–1050.]
- Yan S, Zhu J, Zhu W, Zhang X, Li Z, Liu X, Zhang Q, 2014. The expression of three opsin genes from compound eye of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) is regulated by a circadian clock, light conditions and nutritional status. *PLoS ONE*, 9(10): e111683.
- Yan S, Zhu JL, Zhang J, Zhu WL, Zhang QW, Liu XX, 2012. Effects of low-dose ^{60}Co - γ radiation on the emergence, longevity, phototactic behavior and sex pheromone titer in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) adults. *Acta Entomologica Sinica*, 55(12): 1337–1344. [闫硕, 朱家林, 张璟, 朱威龙, 张青文, 刘小侠, 2012. 低剂量 ^{60}Co - γ 辐射对棉铃虫蛾羽化、寿命、趋光行为和性信息素滴度的影响. *昆虫学报*, 55(12): 1337–1344.]
- Yan S, Zhu JL, Zhu WL, Li Z, Shelton AM, Luo JY, Cui JJ, Zhang QW, Liu XX, 2015. Pollen-mediated gene flow from transgenic cotton under greenhouse conditions is dependent on different pollinators. *Scientific Reports*, 5: 15917.
- Zhang DX, Hewitt GM, 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*, 12(3): 563–584.
- Zhang QW, 2007. Integrated Pest Management. Beijing: China Agricultural University Press. 158–315. [张青文, 2007. 有害生物综合治理学. 北京: 中国农业大学出版社. 158–315.]
- Zhao XC, Yan YH, Wang CZ, 2003. EAG responses of the male cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) and the male oriental tobacco budworm (*H. assulta*) to female sex pheromones. *Acta Zoologica Sinica*, 49(6): 795–799. [赵新成, 阎云花, 王琛柱, 2003. 雄性棉铃虫和烟青虫对雌性性信息素的触角电生理反应. *动物学报*, 49(6): 795–799.]