



我国华东地区两种茶尺蛾的形态和分子鉴定*

姜楠¹ 刘淑仙^{1,2} 薛大勇¹ 唐美君³ 肖强^{3**} 韩红香^{1**}

(1. 中国科学院动物研究所 动物进化与系统学院重点实验室, 北京 100101; 2. 中国科学院大学, 北京 100049;

3. 中国农业科学院茶叶研究所, 杭州 310008)

摘要 【目的】我国华东地区两种严重危害茶树的害虫灰茶尺蛾 *Ectropis grisescens* Warren, 1894 和茶尺蠖 *Ectropis obliqua* (Prout, 1915) 的形态相似、分类不清, 在农业生产中常常混淆, 给防治工作的开展带来了相当大的困难。为了准确的鉴别灰茶尺蛾和茶尺蠖, 本文对这两种害虫进行了形态学观察和分子特征分析。【方法】对灰茶尺蛾和茶尺蠖成虫、卵、幼虫和蛹的形态特征进行了比较分析; 并对灰茶尺蛾和茶尺蠖的 39 个样本的线粒体 CO I 基因进行了扩增和测序, 分析了两物种种内和种间的遗传距离, 并基于 Kimura-2-parameter 模型, 利用 ML 和 NJ 法构建系统发育树。【结果】灰茶尺蛾和茶尺蠖部分形态学特征具有显著差异; 分子数据表明二者种内和种间遗传距离存在明显的“barcoding gap”, 利用 ML 和 NJ 法构建的系统发育树可以将灰茶尺蛾和茶尺蠖成功的区分开。【结论】基于 CO I 基因的分子鉴定结果与形态学鉴定结果相符合, 可用于害虫防治和相关研究中。

关键词 灰茶尺蛾, 茶尺蠖, 形态特征, 线粒体 CO I 基因, 分类

External morphology and molecular identification of two tea Geometrid moth from southern China

JIANG Nan¹ LIU Shu-Xian^{1,2} XUE Da-Yong¹ TANG Mei-Jun³ XIAO Qiang^{3**} HAN Hong-Xiang^{1**}

(1. Key Laboratory of Zoological Systematics and Evolution, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101,

China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Tea Research Institute of Chinese Academy of

Agricultural Sciences, Hangzhou 310008, China)

Abstract [Objectives] *Ectropis grisescens* Warren, 1894 and *Ectropis obliqua* (Prout, 1915), two serious pests of tea in south-eastern China, are morphologically similar and cannot easily be distinguished, which makes it difficult to conduct research on these pests. To accurately identify *E. grisescens* and *E. obliqua*, we examined and compared morphological characters and the mitochondrial CO I gene sequences of these two species. [Methods] Morphological characters of adults, eggs, larvae and pupae of each species were observed, illustrated, measured and compared. 39 samples of the mitochondrial CO I gene of *E. grisescens* and *E. obliqua* were amplified and sequenced, and the intraspecific and interspecific divergences of the two species were calculated. NJ and ML trees were built based on the Kimura-2-parameter model. [Results] The results show that there are obvious morphological differences between *E. grisescens* and *E. obliqua* and there is an obvious “barcoding gap” in the intraspecific and interspecific divergences of these species that allows them to be distinguished by NJ and ML trees. [Conclusion] The results of morphological identification were consistent with molecular methods based on CO I gene variation. The results should be useful for preventing crop damage by these two pests and related research.

Key words *Ectropis grisescens*, *Ectropis obliqua*, morphological characteristics, mitochondrial CO I gene, taxonomy

* 资助项目: 国家自然科学基金项目 (31172127); 科技部基础性工作专项项目 (2013FY113200, 2011FY120200); 国家基金委动物学特殊学科点 (J1210002)

**通讯作者, E-mail: hanhx@ioz.ac.cn; xqtea@vip.163.com

收稿日期: 2014-04-18, 接受日期: 2014-05-12

灰茶尺蛾 *Ectropis grisescens* Warren, 1894 和茶尺蠖 *Ectropis obliqua* (Prout, 1915) 属鳞翅目 (Lepidoptera) 尺蛾科 (Geometridae) 灰尺蛾亚科 (Ennominae) 埃尺蛾属 (*Ectropis*)，同域分布在我国的华东地区。这两种茶尺蛾主要通过幼虫取食茶树叶片进行为害，是我国茶树的主要害虫之一，常严重影响茶叶的产量和质量，给茶叶生产造成巨大的经济损失 (朱德焰等, 2010；张昌娣, 2013)。

灰茶尺蛾最早在浙江宁波发现，目前在我国河南、上海、安徽、浙江、湖北、江西、湖南、福建和香港广泛分布，国外无分布 (Warren, 1894；Swinhoe, 1902；Wehrli, 1943)。茶尺蠖模式产地是日本，Warren (1894) 曾将它作为灰茶尺蛾的一个变型，Prout (1915) 将其作为灰茶尺蛾的一个亚种，后来 Prout (1930) 通过进一步的研究，发现了其与灰茶尺蛾之间的形态差异，故将其视为一个独立的种，目前已知分布在我国上海、江苏、安徽和浙江；国外仅分布于日本和朝鲜半岛 (Wehrli, 1943；Sato, 1984；K i m *et al.*, 2001)，已知寄主植物主要来自漆树科、五加科、忍冬科、马桑科、壳斗科、胡桃科、樟科、豆科、蔷薇科、清风藤科、杨柳科 (Parson *et al.*, 1999)。由于灰茶尺蛾和茶尺蠖的外部形态特征极为相似，植保和相关研究人员对两者的鉴定经常混淆不清，常将它们统称为茶尺蠖或茶尺蛾。

茶尺蠖核型多角体病毒 (EoNPV) 是茶尺蠖的主要病原性天敌，具有寄主专一性强、不杀伤天敌、无残留毒性、对人畜无害等优点，一直被视为茶尺蠖生物防治的主要措施 (席羽, 2011)。席羽 (2011) 和席羽等 (2011) 研究发现茶尺蠖不同地理种群对 EoNPV 的敏感性水平存在不同程度的差异，低敏感性种群 (安徽潜山、浙江衢州、湖北武汉和湖南长沙等地) 与高敏感性种群

(浙江杭州、江苏宜兴和安徽十字镇) 间的毒力水平差异最高达 700 余倍，并且高敏感性种群 (浙江杭州) 与低敏感性种群 (浙江衢州) 间存在生殖隔离，因此推断低敏感性种群很可能不是茶尺蠖，而敏感性差异则可能是由种间差异造成的表型差异之一。然而，低敏感性种群的分类地位尚不清楚，其是否为茶尺蠖的近缘种即灰茶尺蛾仍有待进一步的研究。

随着分子生物学技术的发展，昆虫分类学领域尝试着利用线粒体基因对相关属种进行分子鉴定。自 2003 年 DNA 条形码被提出以来，分子快速鉴定被推动到高度发展阶段 (Hebert *et al.*, 2003)。基于线粒体 CO I 基因的 DNA 条形码技术已在动物各类群的物种鉴定中被证明是行之有效的方法。在鳞翅目物种分类及鉴定方面，DNA 条形码起到了巨大作用 (Hebert *et al.*, 2004；Hajibabaei *et al.*, 2006；Okyar, 2010；Hausmann *et al.*, 2011；Mutanen *et al.*, 2012；Strutzenberger *et al.*, 2012；Sormacheva *et al.*, 2012；Burns *et al.*, 2013；Herbert *et al.*, 2013；Miller *et al.*, 2014)。

鉴于此，本研究从形态特征和线粒体 CO I 基因两个方面，对我国灰茶尺蛾和茶尺蠖的样品进行了分析鉴定，试图解决这两种茶尺蛾长期以来的分类困扰，为两种茶尺蛾在我国的分布和危害情况调查及其防控技术研究提供基础依据。

1 材料与方法

1.1 样品来源

1.1.1 成虫 自 2009 至 2013 年在河南、安徽、浙江、湖北、江西、湖南和福建共采集灰茶尺蛾样品 98 个；在安徽、浙江和江苏共采集茶尺蠖样品 51 个，日本佐藤力夫 (Sato Rikio) 博士赠予 4 个日本茶尺蠖样品，均保存在北京中国科学院动物研究所动物标本馆 (Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing)。检视了

* 资助项目：国家自然科学基金项目 (31172127)；科技部基础性工作专项项目 (2013FY113200, 2011FY120200)；国家基金委动物学特殊学科点 (J1210002)

**通讯作者，E-mail: hanhx@ioz.ac.cn；xqtea@vip.163.com

收稿日期：2014-04-18，接受日期：2014-05-12

保存在英国自然历史博物馆 (The Natural History Museum, London, UK) 中来自浙江宁波和香港的灰茶尺蛾样品 (包括模式标本) 12 个, 来自日本的茶尺蠖样品 (包括模式标本) 10 个, 此外还检视了保存在德国波恩动物学博物馆

(Zoologische Forschungsinstitut und Museum Alexander Koenig, Bonn, Germany) 的灰茶尺蛾样品 2 个; 来自江苏、上海和日本的茶尺蠖样品 (包括模式标本) 21 个。用于分子研究的样品采集信息见表 1。

表 1 灰茶尺蛾和茶尺蠖样品采集信息和 CO I 基因序列的 GenBank 登录号

Table 1 Collecting data of *Ectropis grisescens* and *Ectropis obliqua* and GenBank accession numbers of CO I sequence

种类 Species	分子号 Sequence ID	采集地点 Collecting locality	采集日期 Collecting date (year-month)	GenBank 登录号 GenBank accession no.
灰茶尺蛾 <i>E. grisescens</i>	01909	湖南长沙 Hunan, Changsha	2010-07	KJ704328
	01912	浙江衢州 Zhejiang, Quzhou	2010-05	KJ704330
	01913	安徽潜山 Anhui, Qianshan	2010-06	KJ704331
	01915	福建武夷山 Fujian, Wuyishan	2012-07	KJ704333
	01916	湖北武汉 Hubei, Wuhan	2011-05	KJ704334
	01917	湖南长沙 Hunan, Changsha	2010-07	KJ704335
	01918	湖南长沙 Hunan, Changsha	2010-07	KJ704336
	01921	浙江衢州 Zhejiang, Quzhou	2010-05	KJ704337
	01922	安徽潜山 Anhui, Qianshan	2010-06	KJ704338
	01924	福建武夷山 Fujian, Wuyishan	2012-07	KJ704340
	01926	湖北武汉 Hubei, Wuhan	2011-05	KJ704342
	01927	湖北武汉 Hubei, Wuhan	2011-05	KJ704343
	01937	湖北武汉 Hubei, Wuhan	2011-05	KJ704344
	01938	江西南昌 Jiangxi, Nanchang	2011-08	KJ704345
	01939	福建宁德 Fujian, Ningde	2011-08	KJ704346
	01940	河南信阳 Henan, Xinyang	2011-07	KJ704347

01942	浙江衢州 Zhejiang, Quzhou	2009-05	KJ704349
01943	浙江衢州 Zhejiang, Quzhou	2009-05	KJ704350
01952	湖南长沙 Hunan, Changsha	2010-07	KJ704351

表 1 (Table 1 continued)

种类 Species	分子号 Sequence ID	采集地点 Collecting locality	采集日期 Collecting date (year-month)	GenBank 登录号 GenBank accession no.
茶尺蠖 <i>E. obliqua</i>	01963	浙江杭州 Zhejiang, Hangzhou	2011-08	KJ704354
	02060	湖北武汉 Hubei, Wuhan	2011-05	KJ704359
	02061	江西南昌 Jiangxi, Nanchang	2011-08	KJ704360
	02062	浙江杭州 Zhejiang, Hangzhou	2011-08	KJ704361
	02063	福建宁德 Fujian, Ningde	2011-08	KJ704362
	02064	河南信阳 Henan, Xinyang	2011-07	KJ704363
	01908	浙江杭州 Zhejiang, Hangzhou	2009-05	KJ704327
	01910	江苏宜兴 Jiangsu, Yixing	2010-06	KJ704329
	01914	安徽十字镇 Anhui, Shizizhen	2010-06	KJ704332
	01923	浙江杭州 Zhejiang, Hangzhou	2009-05	KJ704339
	01925	安徽十字镇 Anhui, Shizizhen	2010-06	KJ704341
	01941	浙江杭州 Zhejiang, Hangzhou	2009-05	KJ704348
	01953	浙江杭州 Zhejiang, Hangzhou	2009-05	KJ704352
	01954	浙江杭州 Zhejiang, Hangzhou	2009-05	KJ704353
	01964	浙江杭州 Zhejiang, Hangzhou	2011-08	KJ704355
	01993	浙江杭州 Zhejiang, Hangzhou	2011-08	KJ704356

02058	浙江杭州 Zhejiang, Hangzhou	2009-05	KJ704357
02059	浙江杭州 Zhejiang, Hangzhou	2009-05	KJ704358
03030	日本新潟 Japan, Niigata	2007-08	KJ704364
03057	日本新潟 Japan, Niigata	2007-08	KJ704365

1.1.2 卵、幼虫和蛹 采集自浙江松阳的灰茶尺蛾和浙江杭州的茶尺蠖, 于中国农业科学院茶叶研究所种植中心养虫室内, 进行人工饲养传代。饲喂茶鲜叶, 饲养条件为 (25±1) ℃, 相对湿度为 50%~70%, 光周期为 L14 : D10。

1.2 形态特征的观察、拍照、测量与鉴定

1.2.1 成虫 研究选取的 26 个形态特征的量度

或比值是分类学上常用的尺蛾鉴别特征 (Sato, 1984; 韩红香和薛大勇, 2011)。在光学显微镜 (Leica) 下观察标本的形态特征并结合 Auto-Montage software version 5.03.0061 (Synoptics Ltd) 系统对形态特征进行拍照和测量 (图 1 和图 2)。本研究中所选取的形态特征及对应的字母缩写见表 2。所有标本参照 Sato (1984) 进行准确鉴定。

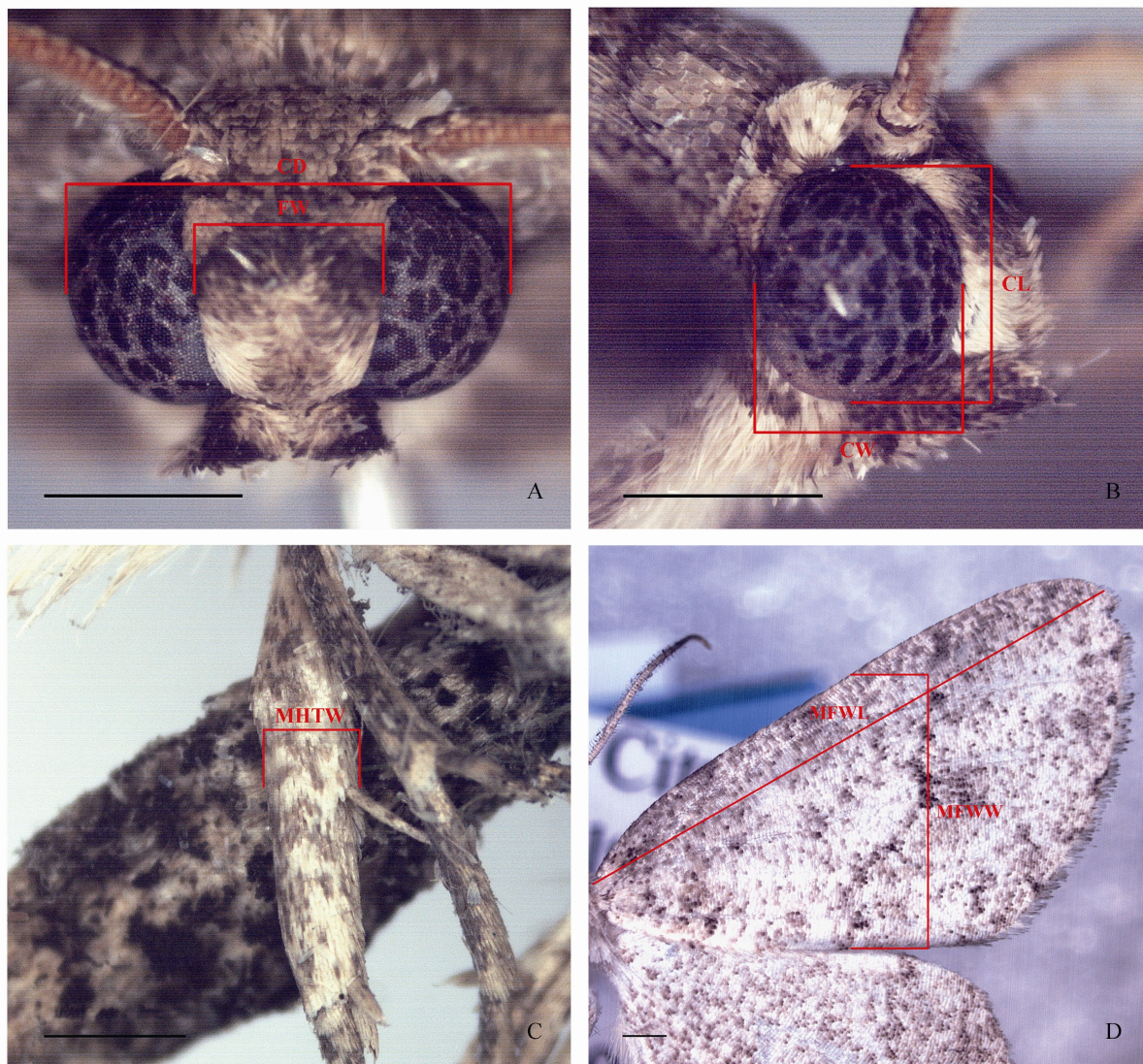


图 1 成虫形态特征测量示意图

Fig. 1 The way to measure the characters of adult

A, B: 头部; C: 足; D: 翅。特征缩写见表 2。比例尺=1 mm。

A, B: Head; C: Leg; D: Wing. Their abbreviations see Table 2. Scale bar =1 mm.

* 资助项目：国家自然科学基金项目（31172127）；科技部基础性工作专项项目（2013FY113200，2011FY120200）；国家基金委动物学特殊学科点（J1210002）

**通讯作者，E-mail: hanhx@ioz.ac.cn；xqtea@vip.163.com

收稿日期：2014-04-18，接受日期：2014-05-12

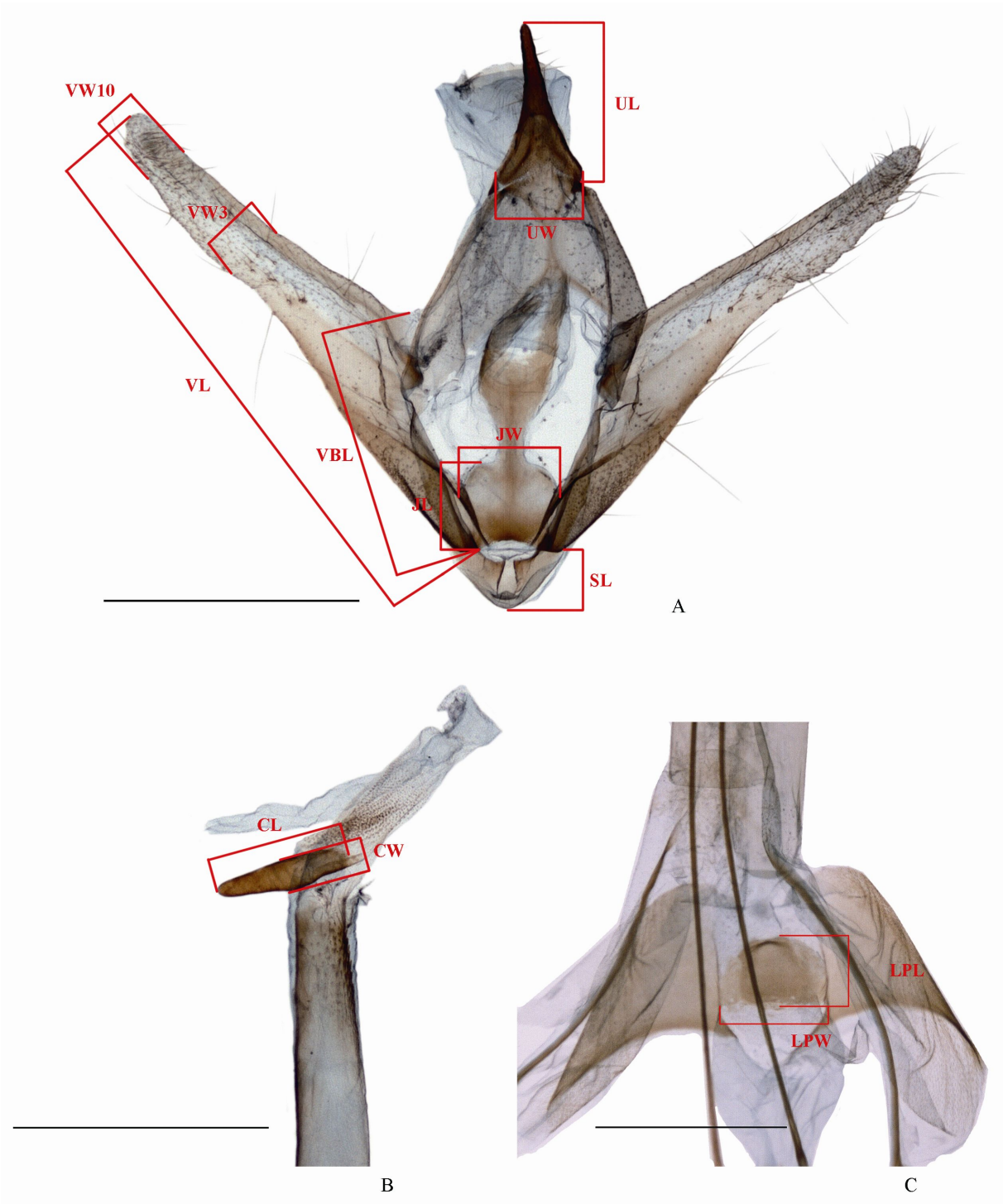


图 2 外生殖器形态特征测量示意图

Fig. 2 The way to measure the characters of genitalia

A, B: 雄性外生殖器; C: 雌性外生殖器; 特征缩写见表 2。比例尺=1 mm。
A, B: Male genitalia; C: Female genitalia. Their abbreviations see Table 2. Scale bar =1 mm.

1.2.2 卵 卵的整体形态观察：在光学显微镜（Leica）下记录卵的形状、颜色、卵表面有无覆盖物，测量卵的高度和宽度。卵的受精孔区形态观察：用 Bouin's 固定液（由北京雷根生物技

术有限公司提供) 固定 12 h 后, 经 30%, 50%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% 的梯度酒精脱水各 5 min, 然后在全自动临界点干燥仪 (Leica EM CPD 300) 中干燥 90 min, 喷金后在环境扫描电子显微镜 (FEI Quanta 450) 下进行观察和拍照。

1.2.3 蛹 在光学显微镜 (Leica) 下观察蛹的形态特征。利用 Auto-Montage software version 5.03.0061 (Synoptics Ltd) 进行拍照并测量蛹的宽度和高度。

1.2.4 幼虫 用 Bouin's 固定液 (由北京雷根生物技术有限公司提供) 固定 12 h 后, 用 75% 酒精清洗, 然后保存于 75% 酒精中。观察时将幼虫放入培养皿中, 在光学显微镜 (Leica) 下对

幼虫的形态特征进行观察。利用尼康相机进行拍照。

1.3 成虫形态数据的单因子方差分析

用 Excel2010 和 SPSS19.0 (SPSS, Inc) 软件进行数据处理, 其中用 SPSS19.0 计算灰茶尺蛾和茶尺蠖成虫形态特征测量值的平均值 (Mean) 和标准差 (Stand deviation, SD), 并进行单因子方差分析, 以比较灰茶尺蛾和茶尺蠖种间成虫形态特征的差异。

1.4 DNA 提取、PCR 反应及测序

本实验 DNA 提取所用试剂盒为 Qiagen 公司提供的 DNeasy Blood & Tissue Kit (中国北京凯

表 2 观察和测量的形态特征及其字母缩写
Table 2 The characters observed and measured and their abbreviations

缩写 Abbreviations	变量 Variables	缩写 Abbreviations	变量 Variables
FW	额宽 Frons width	VL	抱器瓣长 Valva length
CD	复眼间距离 Compound eyes distance	VW10	抱器瓣距端部 1/10 处宽 Valva terminal width
CL	复眼长 Compound eyes length	VW3	抱器瓣距端部 1/3 处宽 Valva terminal width
CW	复眼宽 Compound eyes width	VBW	抱器瓣基宽 Valva basal width
MHTW	雄性后足胫节宽 Male, hind tibia width	JL	阳端基环基部长 Juxta basal length
MFWL	雄性前翅长 Male, forewing length	JW	阳端基环基部宽 Juxta basal width
MFWW	雄性前翅宽 Male, forewing width	SL	囊形突长 Saccus length
FFWL	雌性前翅长 Female, forewing length	CL	角状器长 Cornutus length
FFWW	雌性前翅宽 Female, forewing width	CW	角状器中部宽 Cornutus middle width
UL	钩形突长 Uncus length	LPL	后阴片长 Lamella postvaginalis length
UW	钩形突基宽 Uncus basal width	LPW	后阴片基宽 Lamella postvaginalis basal width

捷)。扩增及测序使用的引物为 LepF1 (5'-ATTC-AACCAATCATAAAGATATTGG-3') (Hebert *et al.*, 2004a) 和 Enh_LepR1 (5'-CTCCWCCAGC-AGGATCAAAA-3') (Hajibabaei *et al.*, 2006), 得到 612 bp 的 CO I 序列。PCR 采用 25 μ L 的反应体系: 2.5 μ L 的 10 $\times$ PCR Buffer (含 Mg^{2+}), 2 μ L dNTPs (2.5 mmol/L), 0.25 μ L Taq DNA 聚合酶, 正反引物各 1 μ L, ddH₂O 15.25 μ L, DNA 模板 3 μ L。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 46 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 5 个循环; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 51 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶检测, 之后由北京华大基因公司的 ABI3730 测序仪进行双向测序。

1.5 序列分析和距离树构建

通过软件 Seqman 5.01 (DNASTAR, Inc. 1996) 进行双向测序结果的拼接, 用软件 MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011) 中 Clustal W 进行序列比对, 并翻译成氨基酸证实序列不包含终止密码子和 gaps。计算碱基含量、遗传变异位点数、简约信息位点; 基于 K2P 模型 (Kimura-2-parameter distance) (Kimura, 1980) 计算种内及种间遗传距离。并用 ABGD (Automatic Barcoding Gap Discovery) (Puillandre *et al.*, 2012) 进行物种划分和遗传距离分析。然后分别使用 MEGA 5.0 和 PAUP*4.0 b10 软件 (Swofford, 2002) 构建 NJ 树 (Neighbour-Joining tree) 和 ML 树 (Maximum Likelihood tree)。

2 结果与分析

2.1 形态鉴定

2.1.1 共同特征 成虫 (图 3): 触角线形, 雄性每节具 2 对纤毛簇; 下唇须尖端未伸达额外;

雄后足胫节膨大, 具毛束; 雄性前翅 R_1 和 R_2 共柄, R_{1+2} 不与 R_{3+5} 共柄, 雌性 R_1 和 R_2 完全合并; 前翅外缘浅弧形, 后翅外缘浅波曲; 翅面多灰褐色, 偶尔为黑色 (黑色个体往往翅面斑纹模糊); 前翅外缘外侧在近中部具 1 黑灰色斑, 有时模糊不可见; 雄第 3 腹节腹板具刚毛斑; 雄性外生殖器的钩形突近三角形, 端部细长且尖锐; 颚形突退化; 抱器瓣简单, 渐细, 端部圆; 抱器背平直; 囊形突端部圆; 阳端基环后端两侧形成 1 对细指状突起; 阳茎细长, 后端部具微刺; 阳茎端膜粗糙, 具 1 个指状角状器, 长度约为阳茎的 1/5; 雌性外生殖器的肛瓣和后表皮突极度延长; 前阴片为 1 对近三角形大骨片, 后端圆; 囊导管具骨环; 囊体椭圆形, 具 1 个囊片; 囊片椭圆形, 边缘具 14 至 16 根长刺。

主要幼期状态 (图 4, 图 5): 卵青绿色, 椭圆形, 高 701~721 μ m, 宽 461~475 μ m, 表面有浅黄褐色絮状物, 受精孔区位于卵的顶部, 具 2 圈花瓣花饰, 内圈为菊花形 (小叶数在灰茶尺蛾中为 6~10 片, 在茶尺蠖中为 7~8 片), 外圈花瓣形状不规则 (小叶数在灰茶尺蛾中为 10~14 片, 在茶尺蠖中为 12~14 片)。幼虫体长 26~30 mm, 头部灰白色, 具黑色斑纹, 上端两侧向外凸出, 额副片黑色, 上唇 M2 刚毛位于 M1 刚毛的下方, 身体表面光滑, 气门桔红色, 边缘黑色, 在 T2 和 T3 节上不明显, 背线和亚背线为黑色双线, 背线在 A1 至 A5 各节上仅中部清楚且略向外凸出, 亚背线在 A5 和 A7 节上模糊不可见, 在 A8 节处加粗呈“八”状, A1 的 SV3 刚毛缺失, L2 刚毛较其他节上的靠近气门下方, A1 至 A5 各节上具 SDX1 刚毛, A8 节背面后方具 1 对角状突起, 其上具 D1 刚毛, 腹足趾钩为双序, 长短相间; 蛹深褐色, 长 10.3~12.7 mm, 宽 3.5~3.8 mm, 表面具刻点, 下唇须小, 近三角形, 臀棘端部二分叉状, 末端细, 前胸腿节明显。

* 资助项目: 国家自然科学基金项目 (31172127); 科技部基础性工作专项项目 (2013FY113200, 2011FY120200); 国家基金委动物学特殊学科点 (J1210002)

**通讯作者, E-mail: hanhx@ioz.ac.cn; xqtea@vip.163.com

收稿日期: 2014-04-18, 接受日期: 2014-05-12

2.1.2 鉴别特征 灰茶尺蛾一般可以利用以下特征与茶尺蠖区别：前翅内线内侧和外线外侧的深色带较模糊，前翅外线在 M_1 附近向外凸出，之后向内倾斜，而茶尺蠖前翅外线在 CuA_1 脉上

方近平直，在 CuA_1 脉下方略向内弯曲；老熟幼虫 A1 至 A4 节背面中央灰色斑纹颜色较茶尺蠖深；茶尺蠖老熟幼虫 A2 节前端常具明显的“八”状黑纹，而灰茶尺蛾则无此特征。

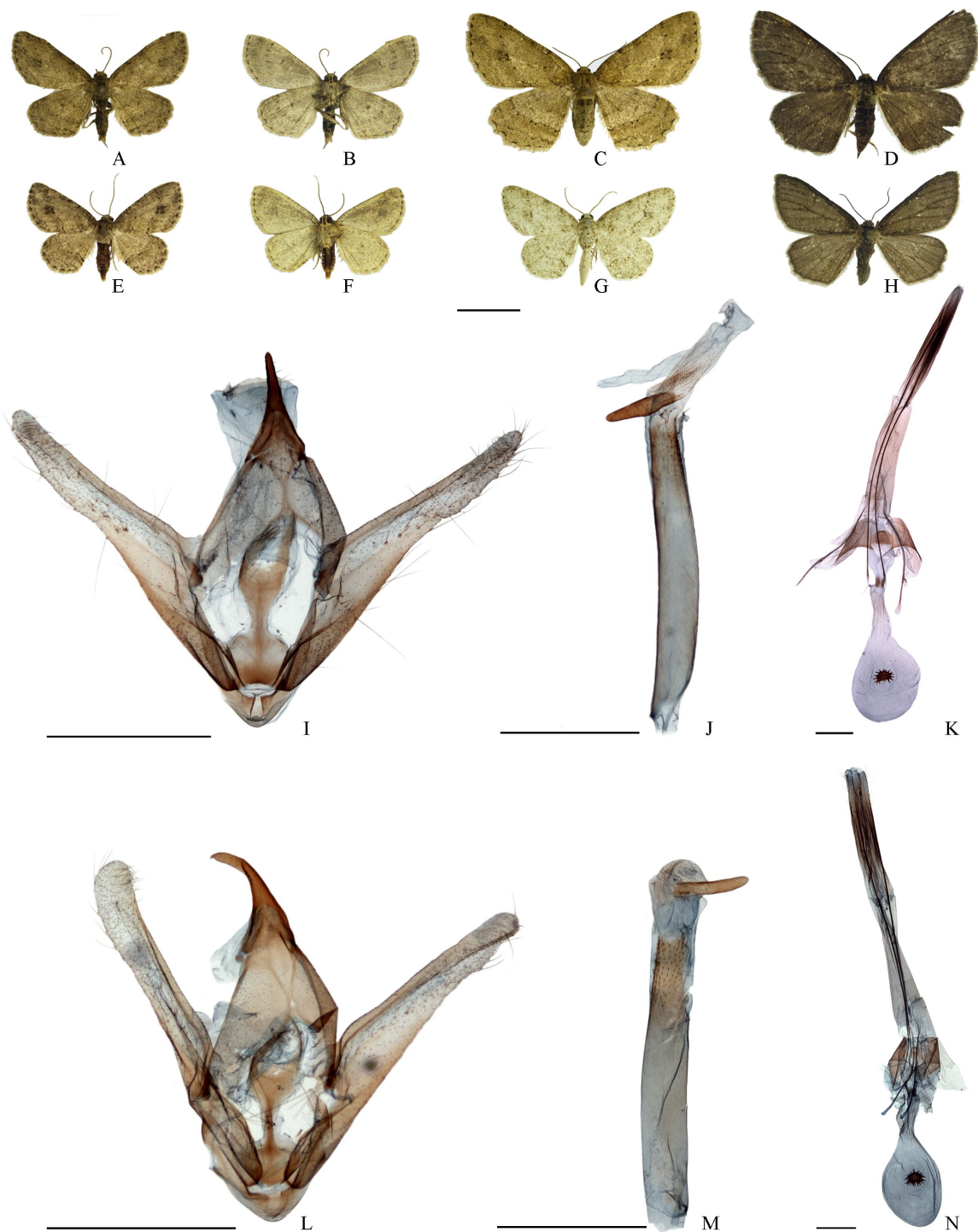


图 3 灰茶尺蛾和茶尺蠖成虫形态图

Fig. 3 Morphology of adults of *Ectropis grisescens* and *Ectropis obliqua*

A, B, C, D, I, J, K: 灰茶尺蛾; E, F, G, H, L, M, N: 茶尺蠖。A: 雄性; B: 雄性 (反面); C, D: 雌性; I, J: 雄性外生殖器; K: 雌性外生殖器; E: 雄性; F: 雄性 (反面); G: 雄性; H: 雌性; L, M: 雄性外生殖器; N: 雌性外生殖器。

比例尺 A~H=1 cm, I~N=1 mm。

A, B, C, D, I, J, K: *E. grisescens*; E, F, G, H, L, M, N: *E. obliqua*. A: Male; B: Male (underside); C, D: Female; I, J: Male genitalia; K: Female genitalia; E: Male; F: Male (underside); G: Male; H: Female; L, M: Male genitalia; N: Female genitalia. Scale bar, A-H=1 cm, I-N=1 mm, respectively.

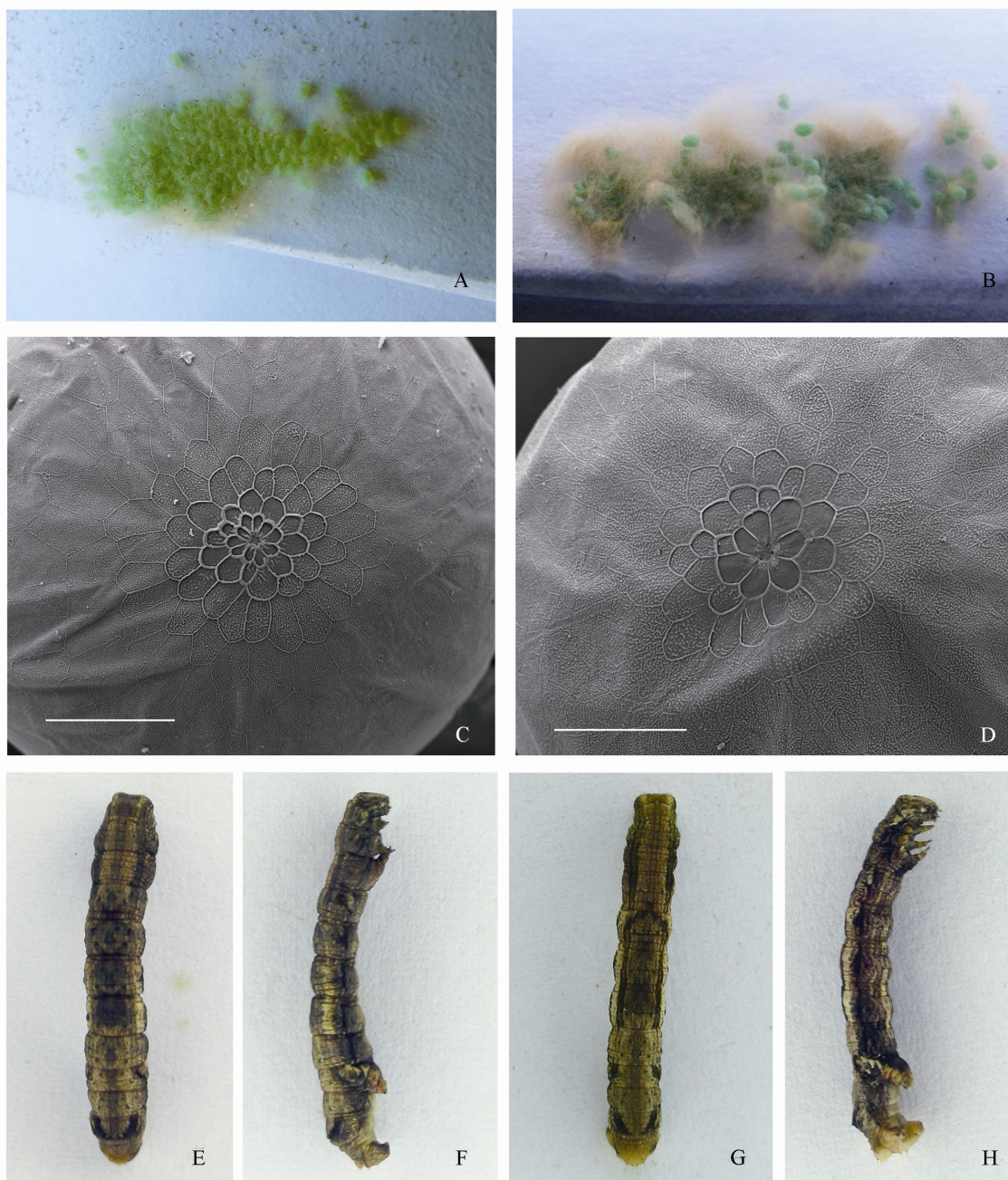


图 4 灰茶尺蛾和茶尺蠖卵和幼虫形态图

Fig. 4 Egg and larva of *Ectropis grisescens* and *Ectropis obliqua*

A, C, E, F: 灰茶尺蛾; B, D, G, H: 茶尺蠖。A, B: 卵的整体形态图; C, D: 卵的受精孔区, 标尺 = 100 μ m; E, G: 老熟幼虫背面观; F, H: 老熟幼虫侧面观。

A, C, E, F: *E. grisescens*; B, D, G, H: *E. obliqua*. A, B: Egg masses; C, D: Micropylar, Scale bar = 100 μ m; E, G: Mature larva in dorsal view; F, H: Mature larva in lateral view.

对灰茶尺蛾和茶尺蠖的 26 个形态参数进行单因子方差分析, 各形态参数的平均值和方差见表 3。结果表明灰茶尺蛾和茶尺蠖之间有 12 个特征差异极显著 ($P < 0.01$), 它们是额宽、复眼间距离、复眼长、复眼宽、雄性后足胫节宽、雄性前翅长、雄性前翅宽、雌性前翅长、雌性前翅宽、钩形突长与基宽的比值、抱器瓣基宽和后阴片长与基宽比值。有 6 个特征差异显著 ($P < 0.05$), 它们是钩形突基宽、囊形突长、角状器中部宽、角状器长与宽的比值和后阴片基宽。

2.2 分子鉴定

本实验获得灰茶尺蛾和茶尺蠖 CO I 基因序

列 39 条 (序列号见表 1)。经 Seqman 5.01 (DNASTAR, Inc. 1996) 拼接双向测序所得到的正反向序列, 获得长为 612 bp 的 CO I 序列。用 MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011) 进行序列比对, 获得的灰茶尺蛾和茶尺蠖的 CO I 序列同源性比对结果见图 6。从图 6 可以看出两物种间在此段 CO I 基因上有 22 个变异位点。基于 Kimura 2-parameter 模型构建了灰茶尺蛾和茶尺蠖的 ML 树和 NJ 树 (图 7), ML 树和 NJ 树的拓扑结构基本一致, 图示为 NJ 树, 从 NJ 树中看出灰茶尺蛾和茶尺蠖明显形成两个分支。另基于 K2P 模型, 计算得到两物种种内遗传距离为 0~2.5%,



图 5 灰茶尺蛾和茶尺蠖蛹形态图和危害情况

Fig. 5 Pupa and pest status of *Ectropis grisescens* and *Ectropis obliqua*

A, B: 灰茶尺蛾; C, D: 茶尺蠖。A, C: 蛹腹面观; B, D: 蛹侧面观; E: 灰茶尺蛾危害情况 (浙江松阳); F: 茶尺蠖危害情况 (浙江义乌)。

A, B: *E. grisescens*; C, D: *E. obliqua*. A, C: Pupa in ventral view; B, D: Pupa in lateral view; E: Pest status of *E. grisescens* (Songyang, Zhejiang); F: Pest status of *E. obliqua* (Yiwu, Zhejiang).

表 3 26 个形态特征的统计描述

Table 3 The statistic analyses of 26 morphological characters

变量 Variables	灰茶尺蛾 <i>E. grisescens</i>			茶尺蠖 <i>E. obliqua</i>			显著性水平 (P) Significance level
	样品数量 Number of samples	平均值 Mean	标准差 SD	样品数量 Number of samples	平均值 Mean	标准差 SD	
FW	56	0.880	0.052	50	0.747	0.063	0.000
CD	56	2.082	0.107	50	1.854	0.105	0.000
CL	56	1.086	0.078	50	0.968	0.088	0.000
CW	56	0.930	0.085	50	0.848	0.085	0.000
CL/CW	56	1.173	0.089	50	1.145	0.010	0.084
MHTW	25	0.550	0.040	15	0.511	0.037	0.004
MFWL	30	13.420	1.072	26	11.501	0.708	0.000
MFWW	30	6.185	0.516	26	5.427	0.379	0.000
FFWL	23	17.125	1.000	26	14.056	0.947	0.000
FFWW	23	7.662	0.637	26	6.274	0.531	0.000
UL	10	0.629	0.026	5	0.648	0.043	0.301
UW	10	0.358	0.032	5	0.311	0.026	0.014
UL/UW	10	1.771	0.1770	5	2.094	0.168	0.005
VL	10	2.044	0.092	4	1.963	0.092	0.162
VW10	10	0.202	0.039	4	0.237	0.042	0.169
VW3	10	0.264	0.040	5	0.234	0.043	0.219
VBW	8	0.895	0.036	5	0.767	0.014	0.000
JL	10	0.276	0.045	4	0.256	0.021	0.422
JW	10	0.353	0.028	4	0.315	0.020	0.026
JL/JW	10	0.781	0.113	4	0.814	0.029	0.593
SL	10	0.224	0.029	4	0.186	0.017	0.032
CL	10	0.466	0.068	5	0.471	0.032	0.868

CW	10	0.129	0.024	5	0.101	0.010	0.030
CL/CW	10	3.689	0.686	5	4.716	0.771	0.021
LPL	10	0.371	0.042	5	0.355	0.057	0.544
LPW	10	0.483	0.045	5	0.385	0.085	0.007
<i>Ectropis grisescens</i>	GGATCAAAAAAGATGTATTAAATTTTCGATCAGTTAATAATATTGTAATAGCCCCAGCTAAACTGGTAAAGATAAG						
<i>Ectropis obliqua</i>	G.....A						
<i>Ectropis grisescens</i>	AGTAATAAGAATGCTGTAATTCCAACAGCTCAACAAATAAAGGTATCTGATCAAATGATAAATTATTTAATCGTATA						
<i>Ectropis obliqua</i>	A.....T..G.....						
<i>Ectropis grisescens</i>	TTAATAATTGTTGTAATAAAATTAATAGCCCCAAGAATTGAGGAAATACCAGCTAAATGTAATGAAAAAATTGCTAAA						
<i>Ectropis obliqua</i>	G.....T.....A.....						
<i>Ectropis grisescens</i>	TCTACTGATCTTCCACCGTGAGCAATATTAGAAGATAAAGGAGGATAAACTGTTTCATCTGTTCTGCTCCATTTTCT						
<i>Ectropis obliqua</i>	A.....A.....G.....G.....						
<i>Ectropis grisescens</i>	ACAATTCTTCTAGAAATTAATAAAGTAAGAGATGGGGTAATAGTCAAAATCTTATATTATTATTCGTGGGAAAGCT						
<i>Ectropis obliqua</i>	G.....A.....						
<i>Ectropis grisescens</i>	ATATCAGGAGCTCCTAATATTAAAGGTACTAATCAATTTCCAAATCCTCCGATTATAATTGGTATTACTATAAAAAAA						
<i>Ectropis obliqua</i>	G.....G.....A.....						
<i>Ectropis grisescens</i>	ATTATAATAAAGCATGAGCGTTACAATAGTATTATAAATTTGATCATCTCCAATTAAGAACCTGGGTTACCTAAT						
<i>Ectropis obliqua</i>	A.....						
<i>Ectropis grisescens</i>	TCTGCTCGAATTAATAATCTTAAAGAAGTTCTACCATCCCAGCTCAAATTCAAAAATAAAATATAATGTTCCAATA						
<i>Ectropis obliqua</i>	G.....T..T.....C.....						

图 6 灰茶尺蛾和茶尺蠖的 CO I 序列比对结果

Fig. 6 The comparison outcome of CO I gene sequence of *Ectropis grisescens* and *Ectropis obliqua*

种间遗传距离为 3.2%~4.0%。每个种的种内遗传距离远远小于种间遗传距离，种内和种间遗传距离存在明显的“barcoding gap”。我们同时采用 ABGD 软件对灰茶尺蛾和茶尺蠖的样本进行物种划分和遗传距离分析，分析结果表明同一物种的个体可以同其他物种的个体很好的区分开。分子鉴定结果与形态鉴定结果相符合。

3 结论与讨论

由于灰茶尺蛾和茶尺蠖是两个形态上极为相似的近缘种，两者的区别鉴定一直是防治工作中的一个难题。本文基于全虫态的形态学研究和 DNA 条形码两种方法对灰茶尺蛾和茶尺蠖进行了有效鉴定。在形态特征方面，灰茶尺蛾与茶尺蠖的卵、幼虫、蛹和成虫的部分特征相似，但灰茶尺蛾的老熟幼虫斑纹和成虫翅面斑纹与茶尺蠖略有区别，雄性外生殖器的角状器中部较茶尺

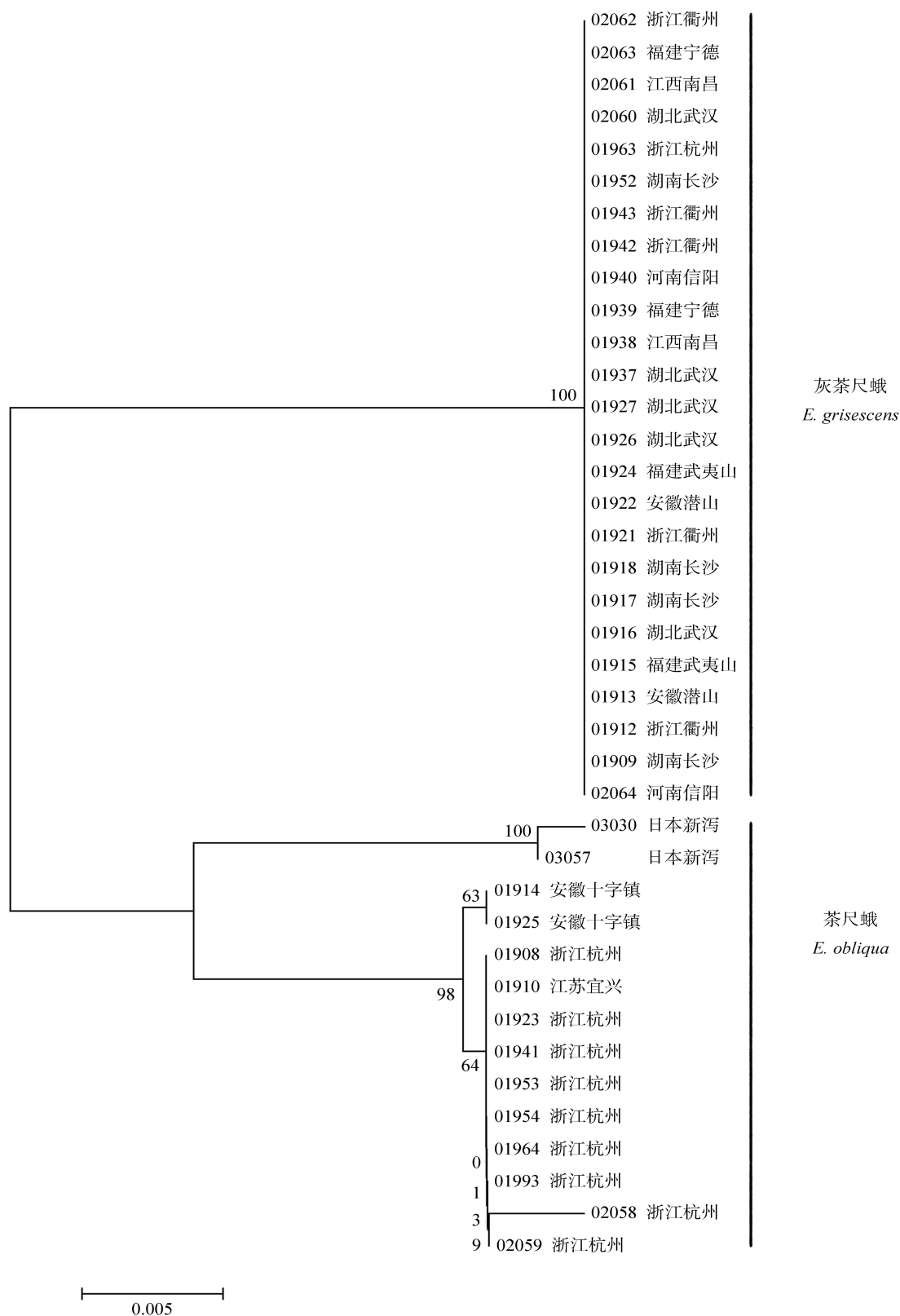
蠖粗壮，雌性外生殖器的后阴片较茶尺蠖小。此外，本文首次利用统计学方法对灰茶尺蛾和茶尺蠖的形态差异进行了定量分析。通过对这两个种的 26 个形态参数进行单因子方差分析，结果发现灰茶尺蛾还可利用以下的定量特征与茶尺蠖进行区分：额较宽；复眼间的距离较大；复眼较大；雄性后足胫节较膨大；前翅较长且较宽；雄性外生殖器的钩形突基部较宽，钩形突长与基宽的比值较小；抱器瓣基部较宽；囊形突较长；角状器中部较宽；雌性外生殖器的后阴片基部较宽。从以上结果中可以看出，灰茶尺蛾区别特征的数值均较茶尺蠖的大，这可能与体型大小有关。一些生态学研究表明体型大小的差异很可能加强近缘种的稳定共存，从而提高群落的多样性和稳定性（刘迺发和李仁德，1995；Bagchi and Ritchie, 2012）。

在分子数据方面，通过对线粒体 CO I 基因 612 bp 序列的测定和比较分析，发现不同地点采

集的灰茶尺蛾和茶尺蠖个体得到了成功的区分, 序列信息的聚集结果和形态学鉴定的种类归属完全一致。

此外, 通过对席羽 (2011) 和席羽等 (2011) 研究中低敏感性种群样品的形态和分子鉴定, 本

研究发现低敏感性种群属于灰茶尺蛾。因此, EoNPV 只对茶尺蠖具有较高的致病力, 而对于灰茶尺蛾的致病力较低, 由此可见今后仍有必要研究专门针对灰茶尺蛾的病毒制剂, 从而对该物种进行有效的生物防治。



* 资助项目：国家自然科学基金项目（31172127）；科技部基础性工作专项项目（2013FY113200，2011FY120200）；国家基金委动物学特殊学科点（J1210002）

**通讯作者，E-mail: hanhx@ioz.ac.cn；xqtea@vip.163.com

收稿日期：2014-04-18，接受日期：2014-05-12

图 7 基于 CO I 序列和 K2P 模型构建的 NJ 树 (图中分支上为自举检验支持率)

Fig. 7 Neighbour-Joining (NJ) tree based on CO I sequences and Kimura-2-parameter model with bootstrap percentages shown on the clades

通过本研究提供的灰茶尺蛾和茶尺蠖的形态学鉴定方法和分子鉴定方法, 植保和相关研究人员一方面可以从形态上, 利用本文归纳出的鉴别特征对这两个近缘的茶树害虫进行区分; 另一方面, 可以直接利用我们上传到 BOLD 数据库中的序列以及鉴定结果, 对未知个体进行鉴定。具体步骤为: (1) 通过分子实验获得所需鉴定物种的 CO I 序列, (2) 打开 BOLD 数据库 (<http://www.boldsystems.org/>), 选择 “Identification” 选项。(3) 在新打开的页面下, 选中 “Species Level Barcode Records”, 将实验获得的茶尺蛾序列粘贴在 “Enter Sequences” 中, 点击页面下端的 “Submit” 按钮。(4) 鉴定结果会在新打开的网页中显示。此外, 工作人员也可以将 NCBI 或 BOLD 上的灰茶尺蛾和茶尺蠖序列下载下来, 与需要鉴定的个体序列在 MEGA5.0 软件中比对, 计算遗传距离或者构建 NJ 树。以上两种方法将有助于今后植保和相关研究人员快速有效的鉴定这两种重要的茶树害虫。

致谢: 感谢日本佐藤力夫 (Sato Rikio) 博士赠予 4 个日本茶尺蠖样品。感谢中国科学院动物研究所杨超女士制作并解剖灰茶尺蛾和茶尺蠖标本。

参考文献 (References)

- Bagchi S, Ritchie ME, 2012. Body size and species coexistence in consumer-resource interactions: A comparison of two alternative theoretical frameworks. *Theor. Ecol.*, 5(1): 141–151.
- Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W, Hajibabaei M, 2013. DNA barcodes reveal yet another new species of *Venada* (Lepidoptera: Hesperiiidae) in Northwestern Costa Rica. *Proc. Ent. Soc. Wash.*, 115(1): 37–47.
- Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, Hallwachs W, Hebert PDN, 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *PNAS*, 103(4): 968–971.
- Hausmann A, Haszprunar G, Hebert PDN, 2011. DNA barcoding the geometrid fauna of Bavaria (Lepidoptera): successes, surprises, and questions. *PLoS ONE*, 6(2): e17134.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR, 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. B*, 270(1512): 313–321.
- Hebert PDN, Dewaard JR, Zakharov EV, Prosser SW, Sones JE, McKeown JT, Mantle B, La Salle J, 2013. A DNA ‘Barcode Blitz’: Rapid Digitization and Sequencing of a Natural History Collection. *PLoS ONE*, 8(7): e68535. doi:10.1371/journal.pone.0068535.
- Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W, 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *PNAS*, 101(41): 14812–14817.
- Kim SS, Beljaev EA, Oh, SH, 2001. Illustrated catalogue of Geometridae in Korea (Lepidoptera: Geometrinae, Ennominae) // Park KT (ed.). Insects of Korea Series 8. Korea: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology & Center for Insect Systematics. 1–278.
- Kimura M, 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16(2): 111–120.
- Miller SE, Martins DJ, Rosati M, Hebert PDN, 2014. DNA barcodes of moths (Lepidoptera) from Lake Turkana, Kenya. *Proc. Ent. Soc. Wash.*, 116(1): 133–136.
- Mutanen M, Hausmann A, Hebert PDN, Landry JF, DeWaard JR, Huemer P, 2012. Allopatry as a gordian knot for taxonomists: Patterns of DNA barcode divergence in Arctic-Alpine Lepidoptera. *PLoS ONE*, 7(10): e47214.
- Okyar Z, 2010. A study on Geometrid moths (Lepidoptera) of the Eastern Black Sea Region (Ayder Plateau-Kaçkar Mountain-Turkey), with three new records. *J. Kans. Ent. Soc.*, 83(3): 193–200.
- Parsons MS, Scoble MJ, Honey MR, Pitkin LM, Pitkin BR, 1999. The catalogue // Scoble MJ (ed.). Geometrid Moths of the World: A Catalogue (Lepidoptera, Geometridae). Vol. 1 and 2. Collingwood (Australia): CSIRO Publishing; Stenstrup (Denmark): Apollo Books. 1–1016.
- Prout LB, 1912–1916. The Palaearctic Geometrae // Seitz A (ed.). The Macrolepidoptera of the World. Vol. 4. Stuttgart: Alfred Kernen Publisher. 1–479, pls 1–25.
- Prout LB, 1930. On the Japanese Geometridae of the Aigner collection. *Novit. Zool.*, 35: 289–377.

- Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, Achaz G, 2012. ABGD, automatic barcode gap discovery for primary species delimitation. *Mol. Ecol.*, 21(8): 1864–1877.
- Sato R, 1984. Taxonomic study of the genus *Hypomecis* Hübner and its allied genera from Japan (Lepidoptera: Geometridae: Ennominae). *Special Bulletin of Essa Entomological Society*, 1: 1–213.
- Sormacheva I, Smyshlyaev G, Mayorov V, Blinov A, Novikov A, Novikova O, 2012. Vertical evolution and horizontal transfer of CR1 non-LTR retrotransposons and Tc1/mariner DNA transposons in Lepidoptera species. *Mol. Biol. Evol.*, 29(12): 3685–3702.
- Strutzenberger P, Brehm G, Fiedler K, 2012. DNA barcode sequencing from old type specimens as a tool in taxonomy: A case study in the diverse genus *Eois* (Lepidoptera: Geometridae). *PLoS ONE*, 7(11): e49710.
- Swinhoe C, 1902. New and little known species of Drepanulidae, Epiplemididae, Microniidae and Geometridae in the national collection. *Trans. R. Ent. Soc. Lond.*, 1902(3): 584–677.
- Swofford DL, 2002. PAUP 4.0 b10: Phylogenetic analysis using parsimony.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using likelihood, distance, and parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28(10): 2731–2739.
- Warren W, 1894. New genera and species of Geometridae. *Novit. Zool.*, 1: 366–466.
- Wehrli E, 1938–1954. Subfamilie: Geometrinae // Seitz A (ed.). Gross-Schmett. Erde. Vol. 4 (Supplement). Stuttgart: Verlag A. Kernen. 254–766, taf. 19–53.
- 韩红香, 薛大勇, 2011. 中国动物志, 昆虫纲 第五十四卷, 鳞翅目尺蛾科尺蛾亚科. 北京: 科学出版社. 1–787. [Han HX, Xue DY, 2011. Animal volunteers of China, Insect, Volume 45. Beijing: Science Press, 1–787]
- 刘迺发, 李仁德, 1995. 三种荒漠蜥蜴空间和营养生态位研究. 生态学报, 15(1):18–53. [Liu XF, Li RF, 1995. Spatial and trophical niches of three species of lizards in desert. *Acta Ecologica Sinica*, 15(1):18–53]
- 席羽, 2011. 茶尺蠖地理种群对茶尺蠖核型多角体病毒的敏感性差异及遗传变异研究. 硕士学位论文. 杭州: 中国农业科学院茶叶研究所. [Xi Y, 2011. Susceptibility variation against *Ectropis obliqua* Nucleopolyhedrovirus and genetic variation in geographic populations of tea geometrid, *Ectropis obliqua* Prout. Master Thesis. Hangzhou: Institute of Tea, Chinese Academy of Agricultural Sciences.]
- 席羽, 殷坤山, 肖强, 2011. 不同地理种群茶尺蠖对 EoNPV 的敏感性差异研究. 茶叶科学, 31(2): 100–104. [Xi Y, Yin KS, Xiao Q, 2011. The susceptibility difference against EoNPV in different geographic populations of tea geometrid (*Ectropis obliqua* Prout). *Journal of Tea Science*, 31(2): 100–104.]
- 张昌娣, 2013. 茶树茶毛虫与茶尺蠖的发生与防治. 现代农村科技, (10): 29. [Zhang CD, 2013. The outbreak and management of *Euproctis pseudoconspersa* and *Ectropis grisea*. *Modern Agricultural Technology*, (10): 29]
- 朱德焰, 吕立哲, 张顺, 蒋双丰, 党永超, 2010. 信阳茶区茶树主要害虫大量发生原因及防治对策. 中国果菜, (11): 38–39 [Zhu DY, Lv LZ, Zhang S, Jiang SF, Dang YC, 2010. The cause and control management of main insect pests in tea of Xinyan. *China Fruit and Vegetable* (11): 38–39].