应用昆虫学报 *Chinese Journal of Applied Entomology* 2018, 55(4): 667−678. DOI: 10.7679/j.issn.2095−1353.2018.084

基于线粒体 COⅠ基因黑唇苜蓿盲蝽种群遗传结构与遗传多样性分析*

张利娟** 雒珺瑜 张 帅 马 妍 王春义 吕丽敏 朱香镇 崔金杰***

（中国农业科学院棉花研究所/棉花生物学国家重点实验室，安阳 455000）

摘 要 **【目的】** 黑唇苜蓿盲蝽 *Adelphocoris nigritylus* Hsiao 作为一种植食性昆虫，近年来越来越多的个体有转向农作物取食危害的趋势。本研究旨在探讨黑唇苜蓿盲蝽在中国北部地区的种群遗传结构、遗传多样性、系统发育和种群历史动态。**【方法】** 针对 10 个地理种群 256 头个体线粒体 COⅠ基因片段（893 bp）进行种群遗传分析。**【结果】** 共检测到 33 个单倍型，确定 1 个祖先单倍型 H5 和 3 个高频率单倍型。Mantel 检测显示种群间遗传距离与地理距离没有显著的相关性。中性检验和 Beast 分析显示种群整体经历了扩张。AMOVA 和种群间成对 F_{st} 分析表明种群间遗传差异整体较低。Migrate 分析显示种群间存在大量的基因流。BI 单倍型系统发育树和 Network 网络中介图分析显示种群在整体扩张的同时，部分种群个体已经出现了遗传分化并形成独立的遗传支系，虽然各种群遗传单系还没有形成。**【结论】** 作者推测人为干扰可能是导致黑唇苜蓿盲蝽整体扩张的主要原因；种群间高水平的基因流是导致低遗传差异的重要原因；廊坊种群与其它种群间存在显著的遗传差异和低的遗传多样性，可能是由于该种群在扩张过程中发生了遗传漂变。

关键词 黑唇苜蓿盲蝽，遗传结构，基因流，遗传漂变，种群扩张

Population genetic structure and genetic diversity of *Adelphocoris nigritylus* based on mtDNA COⅠ gene sequence variation

ZHANG Li-Juan** LUO Jun-Yu ZHANG Shuai MA Yan WANG Chun-Yi
LÜ Li-Min ZHU Xiang-Zhen CUI Jin-Jie***

(State Key Laboratory of Cotton Biology, Institute of Cotton Research of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Anyang 455000, China)

Abstract **[Objectives]** *Adelphocoris nigritylus* Hsiao is a phytophagous insect that feeds on a wide variety of plants and in recent years has damaged agricultural crops. This study aims to explore the population genetic structure, genetic diversity, phylogeny and demographic history of this species in North China. **[Methods]** We applied the population genetic approach to analyze variation in the mitochondrial DNA COⅠ gene fragment (893 bp) of 256 individuals from 10 populations. **[Results]** A total of 33 haplotypes were found, including one source haplotype (H5) and three high frequency haplotypes. A Mantel test indicated no significant correlation between genetic and geographic distance among populations. A Neutrality test and Beast analysis indicated that all populations may have experienced population expansion. An AMOVA and paired F_{st} values revealed relatively low genetic differentiation among populations, and Migrate indicated a high level of gene flow among populations. A BI phylogenetic tree and Network analyses indicated evidence of overall population expansion, but also of distinct genetic clades in some individual populations and sub-regions, although monophyletic groups have not yet developed. **[Conclusion]** We speculate that human activity may be the main reason for the apparent population expansion of *A. nigritylus* in north China. The relatively low genetic differentiation among populations is probably due to the high level of gene flow between them. The

*资助项目 Supported projects：国家自然科学基金青年项目（31601888）；转基因生物新品种培育重大专项（2016ZX08011-002）

**第一作者 First author，E-mail：zhlj042@126.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：aycuijinjie@163.com

收稿日期 Received：2017-08-29，接受日期 Accepted：2017-10-11

significantly high genetic differentiation between the Langfang population and other populations, and the relatively low genetic diversity in the Langfang population, suggests that genetic drift may have occurred during the process of population expansion in this population.

Key words *Adelphocoris nigritylus*, genetic structure, gene flow, genetic drift, population expansion

黑唇苜蓿盲蝽 *Adelphocoris nigritylus* Hsiao，1962 属于盲蝽科（Miridae）苜蓿盲蝽属 *Adelphocoris*，寄主植物主要包括农作物（如棉花、马铃薯、苜蓿草）、杂草（如葎草、蒿、藜、牛筋草等）、地肤子等，以卵在杂草杆和树皮内越冬。近年来随着转基因棉花的大量种植，广谱性杀虫剂的减少使用，在棉田中经常发现该虫取食危害棉花嫩叶，嫩铃等部位，对其产量和质量造成重大损失。《中国动物志》标本采集记录中显示该种类在中国分布范围较广（郑乐怡，1998）。截至目前，关于该种的研究主要集中于外部形态特征的描述，地理分布区域和线粒体基因组的研究（Wang *et al.*，2014），而关于种群遗传、谱系地理学方面鲜有报道。

种群遗传多样性和遗传结构是群体遗传学研究的重要组成部分。影响遗传多样性的因素包括自然选择、遗传变异、基因流、遗传漂变以及种群内部个体间的自交和亚种群结构，当这些因素中的一种或几种同时在生物种群中起作用时，种群的哈迪-温伯格平衡（Hardy-Weinberg equilibrium）就会被打破，从而导致种群进化。基因流和突变使新的基因在某一群体中固定下来，群体间基因流动频率越高，群体间遗传差异越低。Zhang 等（2017）研究发现牧草盲蝽在新疆地区由于人为干扰导致种群间存在大量高水平的基因流，从而明显削弱了种群间的遗传差异。遗传漂变在种群数量较小的种群中更容易发生，它通常会使局部种群的遗传多样性丢失，加剧种群间分化程度；其表现形式包括奠基者效应（Founder effect）和瓶颈效应（Bottleneck effect）两种。Pierce 等（2014）对世界范围内 Monarch butterflies 的遗传结构进行研究证实遗传漂变在新定殖种群中对等位基因频率和遗传差异形成过程发挥了重要作用。Cao 等（2017）对西花蓟马的研究发现奠基者事件可能是导致江苏扬州种群遗传特异性的主要原因。种群内部个体间大量自交，通常会导致该种群高的基因流和低的遗传差异，例如，相关研究认为种群内部个体间的频繁自交是导致中黑苜蓿盲蝽在中国边沿地区种群高基因流，低遗传多样性的主要原因 (Zhang *et al.*，2015)。另外，随着物种起源种群地理分布范围不断的扩张，通常会导致种群遗传多样性降低和种群间遗传差异的加剧（Eckert *et al.*，2008；Peter and Slatkin，2013），这种扩张种群的谱系地理模式在大量的研究中已经被证实（Spradling *et al.*，2010；Stone *et al.*，2012；Schulte *et al.*，2013）。

本研究中，我们主要收集了来自中国 10 个地理种群的 256 头黑唇苜蓿盲蝽标本，采用线粒体 COⅠ基因片段对黑唇苜蓿盲蝽的种群遗传多样性、遗传结构、系统发育、基因流和种群历史动态进行分析，以期探讨黑唇苜蓿盲蝽中国北部地区种群的谱系地理模式，为后续大范围地理跨度、时间跨度和多分子标记研究该种类提供重要参考依据。

1 材料与方法

1.1 标本收集

本研究于 2012 至 2016 年期间共收集中国北部地区 10 个地理种群黑唇苜蓿盲蝽标本。标本的野外采集主要采用网捕法，借助吸虫管收集成虫，同时，为了避免收集样本来自同一父母本后代，同一种群内样本间采集距离以至少相距 10 km 为准，保证种群内样本的代表性。成虫存放于分析纯无水乙醇中于 -20 ℃冰箱中保存，用于基因组 DNA 的提取。具体的标本收集地点及数量等信息见表 1 和图 1。

1.2 DNA 提取、PCR 扩增、测序

在提取 DNA 之前将黑唇苜蓿盲蝽成虫的腹

表 1　各地理种群收集信息

Table 1　Sampling localities for *Adelphocoris nigritylus* from each sampling population

种群代码 Population code	采集地点 Collection locality	样品量 Number	纬度 Latitude [N]	经度 Longitude [E]	采集时间 Collection date
BJ	北京 Beijing	32	39°54′00″	116°25′12″	2013.VII
DZ	山东德州 Dezhou, Shandong	31	37°25′00″	116°21′00″	2013.VII
HS	河北衡水 Hengshui, Hebei	22	37°42′15″	115°47′42″	2016.VIII
LF	河北廊坊 Langfang, Hebei	14	39°30′11″	116°35′03″	2013.IX
WF	山东潍坊 Weifang, Shandong	22	36°22′01″	119°03′49″	2013.X
ZHZ	河北涿州 Zhuozhou, Hebei	32	39°30′54″	115°57′53″	2012.IV
ZZ	河南郑州 Zhengzhou, Henan	30	34°43′35″	113°54′49″	2013.VII
SH	黑龙江绥化 Suihua, Heilongjiang	24	46°10′31″	126°02′05″	2016.VIII
TL	辽宁铁岭 Tieling, Liaoning	31	42°37′16″	123°40′50″	2013.IX
SL	陕西商洛 Shangluo, Shaanxi	18	34°04′12″	110°03′37″	2015.VIII

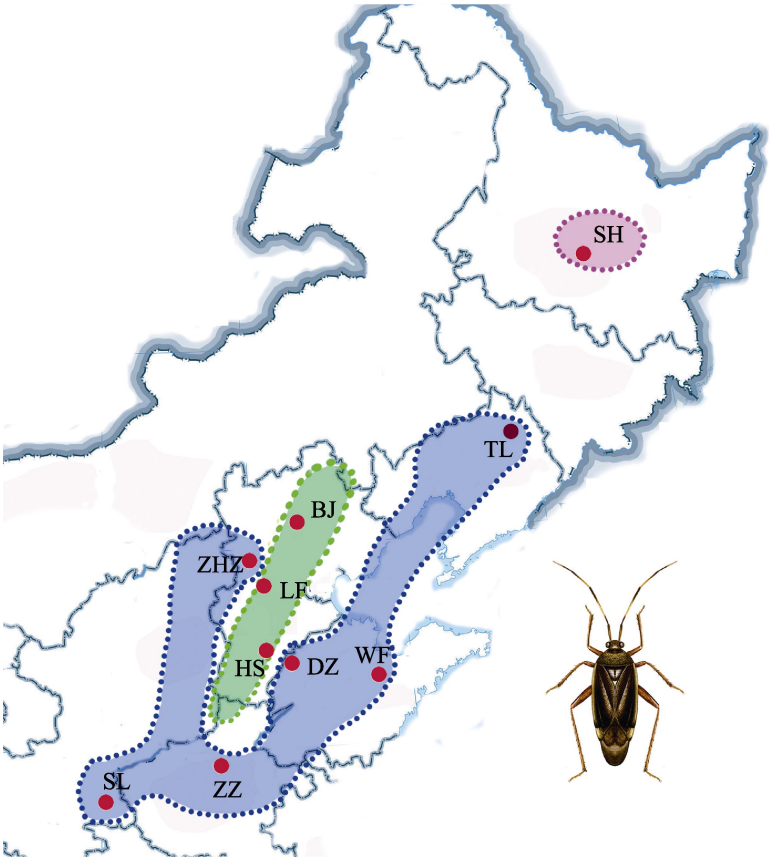


图 1　黑唇苜蓿盲蝽采集地点分布图

Fig. 1　Map of sampling localities of the *Adelphocoris nigritylus*

蓝色区域：第 1 组种群；绿色区域：第 2 组种群；紫色区域：第 3 组种群；图中种群代码的具体地点信息见表 1；地图下载自国家基础地理信息中心网站（http://ngcc.sbsm.gov.cn/）。

Blue indicates populations from first group; green indicates populations from second group; purple indicates populations from third group; The detailed information of collection locality refers to table 1; Map is generated from http://ngcc.sbsm.gov.cn/.

部和翅去除，剩余组织作为实验材料，利用天根公司生产的血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒（TIANamp Genomic DNA Kit）提取 DNA。

以黑唇苜蓿盲蝽线粒体 CO Ⅰ基因序列为模板设计特异性引物序列如下：

Ngri-COI-F: 5′-ATGAATAAATGATTATTT-TCCACAAATCA-3′

Ngri-COI-R: 5′-CTGAATAATTAATATTTG-TGCCATGAATG-3′

引物由上海生工生物公司合成。

PCR 反应体系：2×Taq PCR Master Mix 12.5 μL，10 mol/μL 正反向引物各 1 μL，约 50 ng/μL DNA 模板 2 μL，去离子水补足 25 μL。

PCR 扩增条件：94 ℃预变性 3 min；94 ℃变性 1 min，49 ℃退火 1 min，72 ℃延伸 1 min，共 30 个循环；72 ℃延伸 5 min，4 ℃保存。PCR 扩增产物用 1.5%琼脂糖凝胶进行跑电泳检测，验证目的条带后送上海生工生物公司进行纯化、回收并进行正反双向测序。测序采用 3730XL DNA Genetic Analyser（ABI）测序仪进行全自动测序。

1.3 DNA 序列数据处理、分析

1.3.1 种群遗传多样性分析 利用 BioEdit version 7.2 序列分析软件进行正反向序列的拼接及校对。拼接校对后的序列利用软件 MEGA 6.0（Tamura *et al.*，2013）中的 Clustal W 软件（Larkin *et al.*，2007）进行比对，比对时采用默认的参数。在 MEGA 软件中将核苷酸序列翻译成氨基酸检查序列中间是否有终止密码子及碱基的插入缺失出现；同时利用该软件计算变异位点等信息。利用 DnaSP 5.0 软件（Librado and Rozas，2009）进行种群、组、整个数据集的遗传多样性指数（包括单倍型多样性、核苷酸多样性、多态性位点、平均核苷酸差异数、单倍型数目等）统计。

1.3.2 遗传结构分析 利用 SAMOVA 1.0 软件（Dupanloup *et al.*，2002）对黑唇苜蓿盲蝽不同地理种群间的空间变异进行分析，在 SAMOVA（Spatial analysis of the molecular variance）分析中将 K 值设置为 2-10，重复取样参数设置为 100。利用 Arlequin 3.5（Excoffier and Lischer，2010）分别计算种群间、种群内、组间和组内个体间的遗传变异情况，显著性的检验通过 1 000 次的重复取样实现。利用 Arlequin 软件中的 Tamura and Nei 模型计算种群间成对的遗传距离（F_{st}）矩阵，并将其转换为（F_{st}/1-F_{st}）；利用各地理种群的经纬度信息计算种群间的直线地理距离（km）矩阵，将其转换为对数形式。Mantel 检测通过在线软件 IBDWS 3.23（Jensen *et al.*，2005）计算种群间遗传距离与地理距离的相关性，1 000 次重复抽样进行显著性检验。

1.3.3 基因流、系统发育分析 Migrate 3.6 软件（Beerli and Felsenstein，2001）对基因流的分析基于贝叶斯推理（BI）搜索策略计算突变存在时种群数量（$\theta = xN_e\mu$，x = 遗传参数；μ = 每代每个位点的突变率；N_e = 有效种群数量）；突变存在时的迁移率（$M = m/\mu$，m = 迁入率）。Migrate 运行参数为：贝叶斯推理（BI）搜索策略运行 1 条长链，采用热搜索（Heating）策略重复搜索取样 100 000 000 代，共重复 5 次；热链设置为：1.0，1.2，1.5，3.0；舍弃前 100 000 代样本。为保证结果的准确性，Migrate 共运行 4 次，第一次运行的 Θ 和 M 的初始值由 F_{st} 估计所得，后 3 次均以前一次运行的 Θ 和 M 结果作为后一次的初始值。

利用 jModelTest 2.1（Darriba *et al.*，2012）依据赤池信息量准则（Akaike information criterion，AIC）预测最适合模型 HKY+I+G。MrBayes 3.2（Ronquist and Huelsenbeck，2003）用于系统发育树的构建，建树过程中运行参数设置如下：分别运行 2 条链，每条链运行 4 条马尔科夫链，共运行 10 000 000 代，每 1 000 代抽样一次，运行结束后舍弃前 50%的抽样样本，根据剩余的样本计算一致系统发育树，并计算贝叶斯后验概率。

Network 4.6 软件（Bandelt *et al.*，1999）用于构建单倍型的网络中介图，采用 Median-joining 模型，用于实现单倍型系统发育关系的重建、祖先单倍型推断和单倍型分化与形成时期的推测。利用 MEGA 6.0 软件构建单倍型的 NJ（Neighbor-

joining）系统发育树，选用 Kimura 2-Parameter 模型。系统发育树分支的置信度通过 Bootstrap 自展法进行 1 000 次的重复模拟计算。

1.3.4　历史动态分析　利用 DnaSP 计算 Fu and Li's F^*，Fu and Li's D^*（Fu and Li，1993）；利用 Arlequin 计算 Fu's *Fs* 和 Tajima's *D*，通过这些参数检验种群是否偏离中性进化模型。Fu's *Fs* 和 Tajima's *D* 值为显著的负值时显示种群经历了扩张；Fu's *Fs* 接近于 0 时表明种群为稳定种群；Fu's *Fs* 为显著的正值时表明种群可能经历了瓶颈效应或者种群间出现了分化。

利用软件 BEAST 1.6（Drummond and Rambaut，2007）中的 Bayesian skyline plot（Drummond *et al.*，2005）进行种群扩张时间的推断，使用模型参数同 BI 系统发育树模型，同时两个常见的 CO Ⅰ基因的突变速率 0.011 5/MY（Brower，1994）和 0.017 7/MY（Papadopoulou *et al.*，2010）被使用，以上突变速率在昆虫线粒体 DNA 扩张、分歧时间的估计中已广泛被应用。宽松分子钟模型（Relaxed uncorrelated lognormal molecular clock）下运行 100×10^6 代，每 10 000 代取样一次，应用 Tracer 1.4（Drummond and Rambaut，2007）软件检验各个参数的稳定分布情况，当 ESSs > 200 时表明各参数达到稳定分布。

2　结果与分析

2.1　遗传多样性和遗传结构

256 头标本成功扩增 CO Ⅰ基因片段，序列比对长度为 893 bp，无插入和缺失位点。共检测到 36 个多态性位点，占序列长度的 4.03%，其中 20 个为简约信息位点，16 个为单一变异位点。碱基组成分析发现，A、T、G、C 平均含量分别为 35.54%、31.75%、16.14%、16.58%。SAMOVA 分析结果显示（图 2）：当 $K = 2$ 到 3 时，组间遗传差异 F_{CT} 值呈上升趋势，当 $K = 3$ 到 6 时呈缓慢下降的趋势；$K = 7$ 到 9，F_{CT} 值呈缓慢上升的趋势；组内种群间和种群内遗传差异值 F_{SC} 与 F_{ST} 从 $K = 2$ 到 9 呈明显下降趋势。结合种群间遗传差异分析结果和 SAMOVA 分析，作者选取 $K = 3$ 作为最佳分组数量，第 1 组包括（DZ、WF、ZHZ、ZZ、TL、SL），第 2 组包括（BJ、HS、LF），第 3 组包括（SH）。

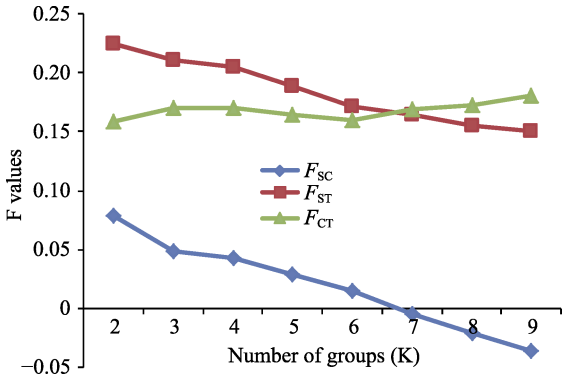


图 2　固定指数（***F***）随着分组组数（***K***）的变化

Fig. 2　The change of fixation indices with *K* values

F_{SC} 代表种群内分化指数；F_{CT} 代表组间分化指数；F_{ST} 代表组内种群间分化指数。

F_{SC} indicates genetic differentiation within populations; F_{CT} indicates genetic differentiation among groups; F_{ST} indicates genetic differentiation among populations within groups.

本研究共检测到 33 个单倍型（Genbank 登录号：MF258414-MF285448），其中单倍型 H2 被 77 个个体共享，单倍型 H1 被 37 个个体共享，单倍型 H20 被 30 个个体共享，以上单倍型为常见单倍型，即每个单倍型均被 20 个以上的个体所共享（表 2）。廊坊种群遗传多样性（H_d、π、*K*）最低，其余种群显示相对高的遗传多样性。当以组为单位进行遗传多样性分析时显示：第一组种群具有相对高的遗传多样性，而第二组种群遗传多样性相对较低（表 3）。

分子遗传变异分析如表 4 所示，廊坊、北京、衡水、绥化 4 个种群与其余种群显示出高而且显著的遗传差异，其余种群间遗传差异（F_{st} 值）较低。组间遗传差异分析均达到显著水平，其中第 2 组与第 3 组间遗传差异最大为 0.245（$P < 0.001$），第 1 和第 2 组间遗传差异为 0.195（$P < 0.001$），第 1 和第 3 组间的遗传差异为 0.138（$P < 0.001$）。3 个层次水平的 AMOVA（Analysis of molecular variance）分析显示组间遗传分化占

表 2 黑唇苜蓿盲蝽各种群单倍型分布

Table 2 Haplotypes distribution of *Adelphocoris nigritylus* in each population

	BJ	DZ	HS	LF	WF	ZHZ	ZZ	SH	TL	SL
Hap1	1	7	3		12	9	5			
Hap2	21	3	10	12	7	13	8	3		
Hap3	7			1		1			7	
Hap4	3									
Hap5		4				1	8		1	8
Hap6		6			1	1				
Hap7		2				1				
Hap8		1								
Hap9		5				1				
Hap10		1								
Hap11		1								
Hap12		1	3							
Hap13			6							
Hap14				1						
Hap15					2					
Hap16						1				
Hap17						3				
Hap18							1			
Hap19								2		
Hap20								4	5	12	9
Hap21								1			
Hap22								1			
Hap23								1			
Hap24									13	3	
Hap25									1	2	
Hap26									1		
Hap27									1		
Hap28										1	
Hap29										1	
Hap30										1	
Hap31										1	
Hap32										1	
Hap33											1

表 3 黑唇苜蓿盲蝽种群遗传多样性参数

Table 3 The parameters of population genetic diversity in *Adelphocoris nigritylus*

种群代码 Population code	单倍型多样性 H_d	核苷酸多样性 π	平均核苷酸差异数 K	单倍型个体数 h	变异位点数 S
BJ	0.528	0.005 43	4.850 8	4	12
DZ	0.880	0.003 43	3.066 7	15	31
HS	0.714	0.006 53	5.831 2	4	12
LF	0.275	0.001 76	1.571 4	3	11
WF	0.619	0.004 74	4.233 8	4	10
ZHZ	0.764	0.005 79	5.169 4	10	14
ZZ	0.832	0.005 79	5.172 4	8	14
SH	0.670	0.006 18	5.518 1	6	16
TL	0.804	0.006 19	5.526 9	11	19
SL	0.582	0.004 87	4.346 4	3	9
第 1 组 First group	0.879 8	0.005 60	5.026 6	29	34
第 2 组 Second group	0.579 5	0.005 60	5.029 0	7	15
第 3 组 Third group	0.670 3	0.006 20	5.518 1	6	16
共计 Total	0.860 0	0.006 14	5.481 2	33	36

表 4　黑唇苜蓿盲蝽种群间遗传差异
Table 4　Genetic differentiation of *Adelphocoris nigritylus* among populations

种群 Population code	BJ	DZ	HS	LF	WF	ZHZ	ZZ	SH	TL	SL
BJ										
DZ	0.207***									
HS	0.132**	0.101*								
LF	- 0.013	0.178**	0.082*							
WF	0.432***	0.133*	0.281***	0.353***						
ZHZ	0.179***	0.006	0.102*	0.131*	0.054					
ZZ	0.231***	0.008	0.114*	0.173**	0.044	- 0.016				
SH	0.283***	0.120**	0.166***	0.231**	0.260***	0.139**	0.125**			
TL	0.356***	0.074*	0.230***	0.305***	0.052	0.055	0.025	0.148**		
SL	0.438***	0.082	0.251**	0.371***	0.043	0.062	0.008	0.188**	- 0.014	

*P<0.05, **P<0.02, ***P<0.001. 下表同。The same below.

总变异的 17.05%，组内种群间的遗传变异占 3.98%，大量的遗传变异来源于种群内部（78.97%）。Mantel 检测结果显示种群间遗传距离与地理距离的相关系数 r = - 0.114，P = 0.806，两者没有显著的相关性。

2.2　基因流、系统发育分析

Migrate 分析结果 M 值显示种群间存在高水平的基因流（表 5），成对种群间未发现不对称基因流现象，但是，第 1 组和第 2 组间呈现出不对称迁移个体的现象，即更多数量的迁移个体从第 2 组种群进入第 1 组种群，反之迁移个体则相对较少。Θ 值表明第一组有效种群数量较高，第 2 组的有效种群数量最低（表 6）。

BI 单倍型系统发育树结果（图 3：A）显示黑唇苜蓿盲蝽种群虽分化为几个遗传支系，但支

表 5　3 组种群间迁移参数（M 和 θ 平均值）的估算
Table 5　The estimation of migration parameters (mean M and θ values) among three groups

源种群 Source population	θ	库种群 M 值的估算 M estimates for sink populations		
		第 1 组 First group→	第 2 组 Second group→	第 3 组 Third group→
第 1 组 First group	0.014 3		848.5	610.0
第 2 组 Second group	0.001 3	479.9		332.5
第 3 组 Third group	0.003 1	559.1	619.1	

表 6　3 组种群间每代的有效迁移数量（N_em 平均值和 97.5% HPD 值）
Table 6　Number of effective migrants per generation (mean N_em and 97.5%HPD values) among three groups

源种群 Source population	Θ（97.5% HPD）	库种群 N_em 值的估算 N_em estimates for sink populations		
		第 1 组 First group→	第 2 组 Second group→	第 3 组 Third group→
第 1 组 First group	0.014 3 (0-0.003)		12.134 **(4.069-22)**	8.723 (1.694-21.941)
第 2 组 Second group	0.001 3 (0.000 07-0.006)	0.624 **(0-20 864)**		0.432 (0-2.418)
第 3 组 Third group	0.003 1 (0.007-0.022)	1.733 (0.009-5.988)	1.919 (0.014-6)	

黑色字体显示不对称的有效迁移个体数。
The blod fonts indicate asymmetrical effective migrants.

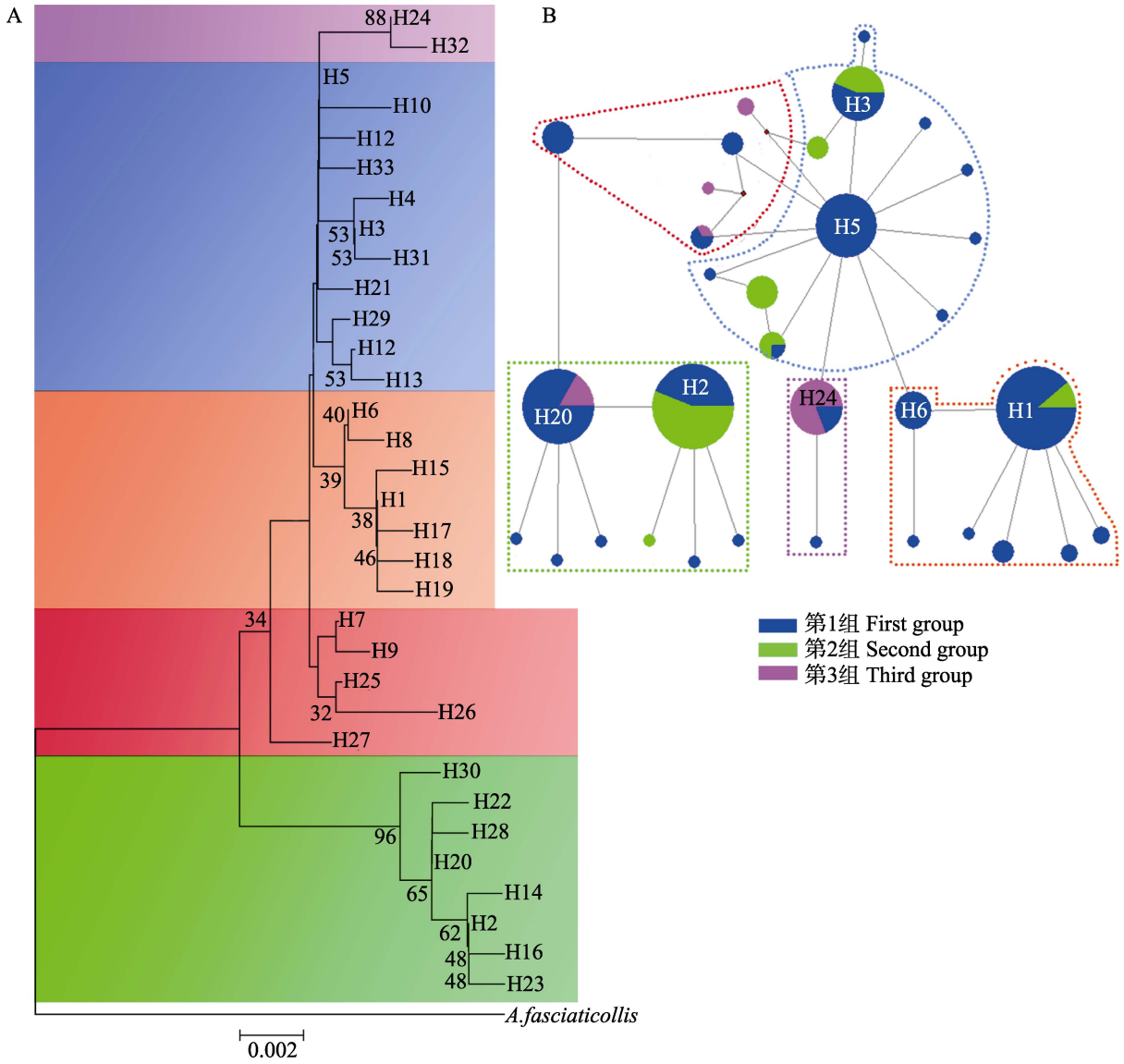


图 3　基于单倍型的 BI 系统发育树（A）和单倍型网络中介图（B）

Fig. 3　Phylogenetic tree inferred by BI method (A) and Median joining network (B) based on the haplotypes

图 A 中各颜色区域所在支系对应图 B 中相应颜色虚线圆框中单倍型所在区域；网络图 B 中每一个圆代表一个单倍型，圆圈大小与单倍型频率呈正比，红色圆点代表缺失单倍型，图 B 中蓝色代表第 1 组种群，绿色代表第 2 组种群，紫色代表第 3 组种群。

The each color region in A corresponds with the dashed box of same color in B. Each circle indicates one haplotype in B. Haplotype circle size indicates the number of individuals observed. Colors correspond to different regions in B. The red solid circles indicate missing haplotypes, the blue indicates populations from the first group, the green indicates populations from the second group, and the purple indicates populations from the third group.

系的支持率普遍较低（低于 80%），除了单倍型 H30、H2 等 8 个单倍型形成一个遗传支系（支持率为 96%）和单倍型 H24 与 H32 形成的一个小的遗传支系（88%），表明黑唇苜蓿盲蝽不同地区种群间分化程度相对较低，地区间还未形成明显的单系。其中支持率为 96%的支系，包括来自 3 组种群的个体。三点苜蓿盲蝽 *Adelphocoris fasciaticollis*（Reuter）作为外群以 100%的支持率与黑唇苜蓿盲蝽种群分离，形成独立支系。

单倍型网络中介图（图 3：B）显示具有一个星状的网络结构（即蓝色虚线框中包括的单倍型），其中常见单倍型 H5（22 个个体共享）位

于星形网络的中间位置，终端单倍型通过突变连接。根据祖先单倍型通常分布范围较广，同时位于网络图的中间位置这一特征，我们推测单倍型 H5 可能为祖先单倍型；其余常见单倍型，例如 H1、H2、H20 等通过多步突变与祖先单倍型相连，这些高频率单倍型虽有终端单倍型连接，但均未形成明显的星状结构，因此这些单倍型可能是黑唇苜蓿盲蝽在进化过程中最近突变形成的。

BI 单倍型系统发育树与 Network 网络图显示一致的的遗传支系分化结果。系统发育树中 5 种颜色区域分别对应网络图中 5 种颜色虚线框内的单倍型，高频率单倍型 H2 和 H20 所在支系包括来自 3 组的种群个体，单倍型 H1 和 H6 所在支系和单倍型 H3 与 H5 所在支系均没有来自东北地区第 3 组种群的个体。

2.3　种群历史动态分析

中性检验结果显示（表 7），当把 10 个种群作为一个整体进行分析时 Fu and Li's *F**、Fu and Li's *D**和 Fu's *Fs* 为显著负值，而 Tajima's *D* 为负值但未达显著水平；当以组为单位进行分析时发现第一组种群与整体的结果一致。将 10 个种群单独进行分析时发现廊坊种群 3 个参数均为显著的负值，只有 Fu's *Fs* 为正值且不显著，因此推测黑唇苜蓿盲蝽整体、第 1 组种群和廊坊种群可能经历了近期种群扩张；其余种群及其余两组并未显示扩张的趋势。利用 Bayesian skyline plot 方法对黑唇苜蓿盲蝽种群历史动态进行估测，结果显示黑唇苜蓿盲蝽整体经历了最近的扩张（图 4），通过使用两种基因突变速率。

2.4　时间尺度的遗传分析

除了以上地理范围内空间尺度的分析，我们也分析了时间尺度[即分别分析了不同采集年份：2012（包括 1 个 ZHZ 种群），2013（包括 BJ、DZ、LF、WF、ZZ、TL 共 6 个种群），2015（包括 1 个 SL 种群）和 2016（包括 HS 和 SH 共 2 个种群）的遗传结构及种群动态，其结果显示：不同年份间种群遗传多样性差异不显著，同时由于不同年份采集样本数量差异较大，因此可能导致此数据结果间的差异；4 年间遗传差异指数 F_{st} 显示，年份间遗传差异相对较低，其中以 2016 年与其余年份间遗传差异最大，与 2012、2013、2015 年间分别为 0.088、0.066、0.175，*P*

表 7　黑唇苜蓿盲蝽种群历史分析

Table 7　Demographic analyses of *Adelphocoris nigritylus* populations

种群 Population code	Tajima's *D*	Fu's *Fs*	Fu and Li's *D**	Fu and Li's *F**
BJ	2.021	7.296	0.993	1.543
DZ	- 0.613	- 1.289	- 0.465	- 0.486
HS	2.703	6.954	1.463*	2.126**
LF	- 2.150 8***	1.913	- 2.819**	- 3.021**
WF	1.853	5.042	0.918	1.384
ZHZ	1.604	0.745	0.250	0.797
ZZ	1.547	2.127	0.273	0.788
SH	1.025	3.789	0.163	0.495
TL	0.930	0.764	- 0.687	- 0.339
SL	2.343	6.457	0.884	1.492
第 1 组 First group	- 0.250	- 22.446***	- 4.107**	- 3.127**
第 2 组 Second group	- 0.509	- 0.996	1.084	1.573*
第 3 组 Third group	0.266	2.931	0.163	0.495
共计 Total	- 0.453	- 25.080***	- 3.889**	- 2.798*

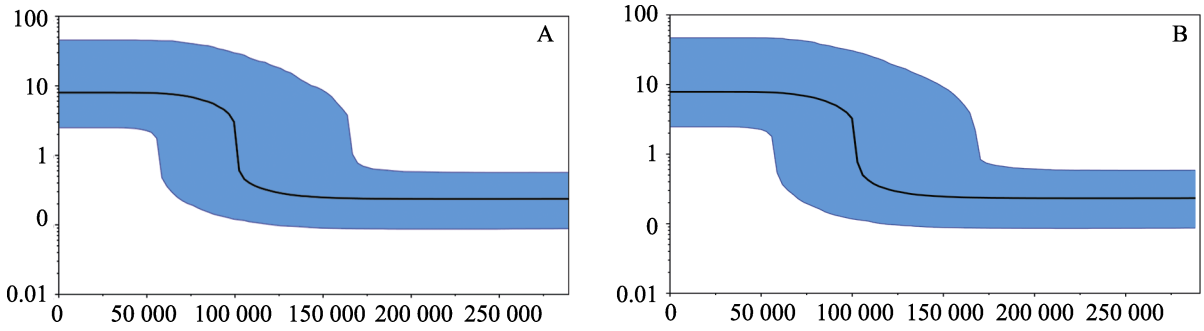


图 4 Bayesian skyline plot 方法推测的有效种群大小随时间的变化趋势

Fig. 4 The changed trend of effective population numbers with the time based on Bayesian skyline plot method

X 轴代表距今的时间量度；Y 轴代表估计的有效种群数量。黑色的实线代表有效种群数量的中间值；蓝色的区域代表95%最大后验密度区间。A. 整体数据基于突变速率 0.011 5/MY；B. 是整体数据基于突变速率 0.017 7/MY。

X-axis is the timescale before present, and Y-axis is the estimated effective population size. Solid curves indicate median effective population size; the shaded range indicates 95% highest posterior density intervals. A. The demographic history of the total based on mutation rate 0.011 5/MY; B. The demographic history of the total based on mutation rate 0.017 7/MY.

值均小于 0.02，达到显著水平；种群历史动态的分析显示，2013 年的中性检验参数均为显著的负值（Fu and Li's F^* = - 3.453，P < 0.02; Fu and Li's D^* = - 2.488, P < 0.05; Fu's Fs = - 16.622，P < 0.001），除了 Tajima's D = - 0.272，P > 0.05，其余年份的中性检验参数均为正值，以上结果显示黑唇苜蓿盲蝽种群在 2013 年经历了扩张，其余年份种群可能并未经历扩张。

3 讨论

组间和种群间成对的 F_{st} 值与 AMOVA 分析结果表明：黑唇苜蓿盲蝽部分种群出现较高而且显著的遗传差异，组间遗传差异分化程度较高而且达到显著水平。第 2 组与第 1 和第 3 两组种群均出现较大程度的遗传分化。遗传距离和地理距离的相关性分析显示两者不具有相关性，表明地理距离并未导致种群间出现遗传分化。并且遗传多样性的分析显示第 2 组中的 3 个种群其遗传多样性相对较低，第 2 组整体的单倍型多样性为 0.579。

第 2 组和第 3 组种群相对较低的遗传多样性，与其余种群间高的遗传差异，以及这两组种群整体上未经历种群扩张。我们推测以上 2 组种群出现这种遗传现状的主要原因可能是由于遗传漂变导致 2 区域内非常少的奠基者个体。另外，第 3 组的黑龙江绥化种群与其余种群间地理距离相隔较远，同时中间存在山脉（大兴安岭、小兴安岭等）、河流（辽河）等地理障碍，这些因素可能减少了与其余种群的基因交流。

在遗传多样性分析中我们发现廊坊种群的遗传多样性最低，明显低于其它种群；同时，中性检测显示该种群可能经历了最近的扩张；这与相关研究是一致的，即正在经历最近扩张的种群其遗传多样性水平普遍较低（Huchon *et al.*，1999；Hampe and Petit，2005）。关于廊坊种群的采集地点，其中一个点位于中国农业科学院植物保护研究所的廊坊基地。采样季节试验田正在进行分小区专门种植大量诱集盲蝽植物（例如，地肤子、紫花苜蓿、马铃薯等作物）的实验期间，因此大量合适的寄主植物可能导致了种群数量的大量增加，但是，低的有效种群数量依然使种群保持着低水平的遗传多样性。当然，我们承认取样数量的差异，即廊坊种群相对较少的采样数量，一定程度上可能会导致种群间分析结果的差异，在后续的相关研究中各种群一致的取样数量以及更多分子标记的应用将被考虑。经历最近种群扩张的黑唇苜蓿盲蝽整体显示高的遗传多样性，作者推测大量起源种群与新定殖种群之间频繁基因交流是主要原因。相关研究已经证明大量基因交流和反复的引入事件会导致新定殖种群高的遗传多样性（Walker *et al.*，2003；Rosenthal *et al.*，2008；Yang *et al.*，2008）。

令我们感到奇怪的是本研究第 1 组种群的采集范围从最北部的辽宁铁岭到最南部的陕西商洛，地理距离达 1 520 km，中间有山脉（例如秦岭、太行山）、河流（例如黄河）作为地理障碍，是什么导致该组种群间低的遗传差异呢？通过基因流的分析，我们发现第 2 组种群间存在高水平的基因流，大量的基因流明显削弱了种群间的遗传差异。Song 等（2013）对一种东方鸟类 *Pycnonotus sinensis*（Gmelin）的研究同样显示种群间大量的基因交换、频繁的基因流导致区域内各种群间低的遗传差异。从时间尺度上来看，2016 年种群样本与其余年份间存在相对高的遗传差异，虽然 2 个取样种群可能不完全具有代表性，但是棉花作为黑唇苜蓿盲蝽取食的主要农作物种类之一，近年来随着其在中国范围内种植结构的调整和种植面积的大量减少，另外，2016 年创下历史之最的特殊气候条件——高温高湿，一定程度上这些因素可能影响了种群年度间的遗传差异。

祖先单倍型 H5 包含的个体主要来自于河南、山东和陕西地区，终端单倍型通过 1 到 2 步突变与其相连。从祖先种群的分布来看，三个地区均处于黄河水流经区域，这一现象与黑唇苜蓿盲蝽的主要寄主植物葎草的传播扩散是一致的，即随着黄河水的开发利用，已经发现葎草种子在山东及其周围地区大量快速传播，因此推测黑唇苜蓿盲蝽祖先种群可能伴随着寄主植物进行扩散转播到达河北、东北地区。另外，黑唇苜蓿盲蝽寄主植物频繁的贸易转运可能导致黑唇苜蓿盲蝽的卵或幼虫伴随寄主植物到达新的栖息地进行生长发育并繁殖后代，从而实现种群空间范围的扩张和种群数量的增加。昆虫及其它动物通过人为干扰或寄主植物携带进行长距离扩散传播从而实现种群扩张在以前的研究中已经被证明，例如梨小食心虫 *Grapholita molesta*（Wei *et al.*，2015）、变异革蜱 *Dermacentor variabilis*（Dergousoff *et al.*，2016）和牧草盲蝽 *Lygus pratensis*（Zhang *et al.*，2017）等。时间尺度上，2013 年种群经历了扩张，分析认为此扩张事件可能与城市扩张人为干扰等因素影响有关，例如，赵舒怡等（2015）的对 2001-2013 年植被覆盖度与干旱条件相关性分析显示河南、河北、北京等农业区的植被覆盖度与气候干旱程度等相关性较弱，由于此地区受到人类活动扰动较严重。

BI 系统树中单倍型 H24 和 H32 所有个体均来自于东北地区（黑龙江绥化和辽宁铁岭），形成一个独立的遗传支系且其支持率达到 88%；组间遗传差异分析显示东北的黑龙江绥化与其余种群间 F_{st} 值达到中等和很大程度的遗传分化；以上分析结果均表明黑唇苜蓿盲蝽东北地区部分个体已经与其它地区种群出现了遗传分化。同时通过最近形成的单倍型 H20 的种群共享情况来看，其大部分个体来自于东北以及陕西商洛地区，但是并没有形成星形结构，而是与 H2 等单倍型在系统发育树中形成一个最近的遗传分支，其中单倍型 H2 大部分个体来自于华北地区，虽然其支持率仅为 62%，但在一定程度上说明黑唇苜蓿盲蝽在进化过程中可能已经形成了新的适应不同生境和环境变化的优势单倍型。

参考文献 (References)

Bandelt HJ, Macaulay V, Richards M, 2000. Median networks: speedy construction and greedy reduction, one simulation, and two case studies from human mtDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 16(1): 8–28.

Beerli P, Felsenstein J, 2001. Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *USA*, 98(8): 4563–4568.

Brower AVZ, 1994. Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *USA*, 91(14): 6491–6495.

Cao LJ, Wang ZH, Gong YJ, Zhu L, Hoffmann AA, Wei SJ, 2017. Low genetic diversity but strong population structure reflect multiple introductions of western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae) into China followed by human-mediated spread. *Evolutionary Applications*, 10(4): 391–401.

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D, 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8): 772–772.

Dergousoff SJ, Lysyk TJ, Kutz SJ, Lejeune M, Elkin BT, 2016. Human-assisted dispersal results in the northernmost canadian record of the american dog tick, *Dermacentor variabilis* (Ixodida: Ixodidae). *Entomological News*, 126(2): 132–137.

Drummond AJ, Rambaut A, 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1): 214.

Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B, Pybus OG, 2005. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 22(5): 1185–1192.

Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L, 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, 11(12): 2571–2581.

Eckert CG, Samis KE, Lougheed SC, 2008. Genetic variation across species' geographical ranges: the central–marginal hypothesis and beyond. *Molecular Ecology*, 17(5): 1170–1188.

Excoffier L, Lischer HEL, 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetic analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3): 564–567.

Fu YX, Li WH, 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 133(3): 693–709.

Hampe A, Petit RJ, 2005. Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters. *Ecology Letters*, 8(5): 461–467.

Huchon D, Delsuc F, Catzeflis FM, Douzery EJP, 1999. Armadillos exhibit less genetic polymorphism in North America than in South America: nuclear and mitochondrial data confirm founder effect in *Dasypus novemcinctus* (Xenartha). *Molecular Ecology*, 8(10): 1743–1748.

Jensen JL, Bohonak AJ, Kelley ST, 2005. Isolation by distance, web service. *BMC genetics*, 6(1): 13.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson TJ, Higgins DG, 2007. Clustal W and clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21): 2947–2948.

Librado P, Rozas J, 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11): 1451–1452.

Papadopoulou A, Anastasiou I, Vogler AP, 2010. Revisiting the insect mitochondrial molecular clock: the mid-Aegean trench calibration. *Molecular Biology and Evolution*, 27(7): 1659–1672.

Peter BM, Slatkin M, 2013. Detecting range expansions from genetic data. *Evolution*, 67(11): 3274–3289.

Pierce AA, Zalucki MP, Bangura M, Udawatta M, Kronforst MR, Altizer S, Haeger JF, de Roode JC, 2014. Serial founder effects and genetic differentiation during worldwide range expansion of monarch butterflies. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 281(1797): 2014–2230.

Ronquist F, Huelsenbeck JP, 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12): 1572–1574.

Rosenthal DM, Ramakrishnan AP, Cruzan MB, 2008. Evidence for multiple sources of invasion and intraspecific hybridization in *Brachypodium sylvaticum* (Hudson) Beauv. in North America. *Molecular Ecology*, 17(21): 4657–4669.

Schulte U, Veith M, Mingo V, Modica C, Hochkirch A, 2013. Strong genetic differentiation due to multiple founder events during a recent range expansion of an introduced wall lizard population. *Biological Invasions*, 15(12): 2639–2649.

Song G, Yu LJ, Gao B, Zhang RY, Qu YH, Lambert DM, Li SH, Zhou TL, Lei FM, 2013. Gene flow maintains genetic diversity and colonization potential in recently range-expanded populations of an Oriental bird, the Light-vented Bulbul (*Pycnonotus sinensis*, Aves: Pycnonotidae). *Diversity and Distributions*, 19(10): 1248–1262.

Spradling TA, Tamplin JW, Dow SS, Meyer KJ, 2010. Conservation genetics of a peripherally isolated population of the wood turtle (*Glyptemys insculpta*) in Iowa. *Conservation Genetics*, 11(5): 1667–1677.

Stone JL, Crystal PA, Devlin EE, Downer RHL, Cameron DS, 2012. Highest genetic diversity at the northern range limit of the rare orchid *Isotria medeoloides*. *Heredity*, 109(4): 215–221.

Tajima F, 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3): 585–595.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S, 2013. Mega 6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725–2729.

Walker NF, Hulme PE, Hoelzel AR, 2003. Population genetics of an invasive species, *Heracleum mantegazzianum*: implications for the role of life history, demographics and independent introductions. *Molecular Ecology*, 12(7): 1747–1756.

Wang Y, Li H, Wang P, Song F, Cai WZ, 2014. Comparative mitogenomics of plant bugs (Hemiptera: Miridae): identifying the AGG codon reassignments between Serine and Lysine. *PLoS ONE*, 9(7): e101375.

Wei SJ, Cao LJ, Gong YJ, Shi BC, Wang S, Zhang F, Guo XJ, Wang YM, Chen XX, 2015. Population genetic structure and approximate Bayesian computation analyses reveal the southern origin and northward dispersal of the oriental fruit moth *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) in its native range. *Molecular Ecology*, 24(16): 4094–4111.

Yang S, Bishop JG, Webster MS, 2008. Colonization genetics of an animal-dispersed plant (*Vaccinium membranaceum*) at Mount St Helens, Washington. *Molecular Ecology*, 17(3): 731–740.

Zhang LJ, Cai WZ, Luo JY, Zhang S, Wang CY, Lv LM, Zhu XZ, Wang L, Cui JJ, 2017. Phylogeographic patterns of *Lygus pratensis* (Hemiptera: Miridae): Evidence for weak genetic structure and recent expansion in northwest China. *PLoS ONE*, 12(4): e0174712.

Zhang LJ, Li H, Li SJ, Zhang AB, Kou F, Xun HZ, Wang P, Wang Y, Song F, Cui JX, Cui JX, Gouge DH, Cai WZ, 2015. Phylogeographic structure of cotton pest *Adelphocoris suturalis* (Hemiptera: Miridae): strong subdivision in China inferred from mtDNA and rDNA ITS markers. *Scientific Reports*, 5: 14009.

Zhao SY, Gong ZN, Liu XY, 2015. Correlation analysis between vegetation coverage and climate drought conditions in North China during 2001-2013. *Acta Geographica Sinica*, 70(5): 717–729. [赵舒怡, 宫兆宁, 刘旭颖, 2015. 2001-2013 年华北地区植被覆盖度与干旱条件的相关分析. 地理学报, 70(5): 717–729.]

Zheng LY, 1998. Fauna Sinica. Beijing: Science Press. 94–96. [郑乐怡, 1998. 中国动物志. 北京: 科学出版社. 94–96.]