

基于 ITS-1 基因的菜粉蝶地理种群遗传分化研究

毛增辉^{1,2}, 郝家胜^{1,*}, 王晨^{3,4}, 于芳^{3,5}, 司曼曼¹, 夏靖¹, 朱朝东^{3,*}

(1 安徽师范大学生命科学学院分子进化与生物多样性研究室, 安徽芜湖 241000 2 安徽师范大学附属中学, 安徽芜湖 241000

3 中国科学院动物研究所动物进化与系统学院级重点实验室, 北京 100080 4 广西师范大学生命科学学院, 广西桂林 541004

5 首都师范大学生命科学学院, 北京 100048)

摘要: 为了探讨我国不同地区菜粉蝶种群之间的遗传分化情况, 本研究运用克隆测序法, 对我国 16 个地区 79 只菜粉蝶 *Pieris rapae* rDNA 的 ITS-1 基因序列进行测定并分析; 同时, 以东方菜粉蝶 *Pieris canidia* 为外群, 重建了它们的系统发生树, 初步探讨了它们的生物地理学分化格局。序列分析结果显示: 所测菜粉蝶的 ITS-1 序列长度介于 337~458 bp 之间。经序列比对后, 在 347 个位点中共有 281 个保守位点, 63 个变异位点, 16 个简约信息位点和 47 个单突变位点; AMOVA 软件分析其核苷酸多态性指数 (nucleotide diversity) P_i 为 0.014 每位点 Theta (per site) E_{θ} 为 0.041, 遗传分化指数 (F_{ST}) 为 0.351 ($P < 0.05$); DnaSP 软件共检测到 48 个单倍型 (haplotype) 序列, 单倍型多样性 (haplotype diversity) 的频率为 0.989。系统发生分析结果表明: 现存的菜粉蝶各地理种群与其地理分布没有直接的对应关系根据系统发生树结果推测, 该蝶种在我国的最早建群可能发生于辽宁、内蒙古及北京一带, 其后, 通过幼虫寄主植物的水陆运输以及成虫的迁飞向我国的不同地区扩散。

关键词: 菜粉蝶; 地理种群; 遗传分化; 系统地理发生; ITS-1 序列

中图分类号: Q968 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2010)10-1144-09

Analysis of genetic variation in different geographical populations of *Pieris rapae* Linnaeus (Lepidoptera: Pieridae) based on rDNA ITS-1 sequence evidence

MAO Zeng-Hui^{1,2}, HAO Jia-Sheng^{1,*}, WANG Chen^{3,4}, YU Fang^{3,5}, SI Man-Man¹, XIA Jing¹, ZHU Chao-Dong^{3,*} (1. Laboratory of Molecular Evolution and Biodiversity College of Life Sciences Anhui Normal University Wuhu Anhui 241000 China 2. The High School Affiliated to Anhui Normal University Wuhu Anhui 241000 China 3. Key Laboratory of Zoological Systematics and Evolution Institute of Zoology Chinese Academy of Sciences Beijing 100101, China 4. College of Life Sciences Guangxi Normal University Guilin Guangxi 541004 China 5. College of Life Sciences Capital Normal University Beijing 100048 China)

Abstract: In order to investigate the genetic variations of different geographical populations of *Pieris rapae* Linnaeus in China, the ribosomal DNA gene interval transcribed spacer 1 (ITS-1) sequences of 79 individuals from 16 areas were determined and analyzed. Upon these gene sequence data and using *Pieris canidia* as the outgroup, we reconstructed phylogenetic trees by means of neighbor-joining and minimum evolution analyses, aiming to clarify their biogeographical divergence pattern. The results of the sequence variation analyses showed that the sizes of the ITS-1 of *Pieris rapae* range from 337 to 458 nucleotides in length. Aligned with the ClustalW software, the total 347 sites, which contain 281 conserved, 63 variable and 16 parsimonious informative, were obtained. Meanwhile, for the whole population of this study, the nucleotide diversity P_i and the Theta (per site) E_{θ} were calculated to be 0.014 and 0.041, respectively. Moreover, total 48 haplotypes were identified and the haplotype diversity 0.989 was obtained by the software DnaSP. Additionally, the fixation index (F_{ST}) 0.351 ($P < 0.05$) was calculated by the analysis of molecular variance (AMOVA) software. The result of phylogenetic analysis indicated no pronounced correlation between their haplotypes and the geographical regions. Based on the phylogenetic trees, it is inferred that the *Pieris rapae* in China probably colonized first in the Liaoning, Inner Mongolia and Beijing.

基金项目: 安徽省优秀青年科技基金 (08040106811); 安徽省“重要生物资源保护与利用”重点实验室及中青年学术与技术带头人专项基金 (590620); 北京市自然科学基金委重点项目 (6081002); 中国科学院动物研究所动物进化与系统学院级重点实验室开放课题 (O529YX5105)

作者简介: 毛增辉, 男, 1982年1月生, 硕士研究生, 主要从事分子系统学研究, E-mail: maxiaosong@schu.com

* 通讯作者 Corresponding authors E-mail: jhansigpas@sina.com; zhucd@iz.ac.cn

收稿日期 Received: 2010-03-05 接受日期 Accepted: 2010-09-15

and then spread to other areas by transportation of their host plants and migration of their adults

Key words *Pieris rapae* geographical population genetic diversity phylogeography ITS-1 sequences

菜粉蝶 *Pieris rapae* Linnaeus 隶属于昆虫纲 (Insecta), 鳞翅目 (Lepidoptera), 粉蝶科 (Pieridae), 粉蝶属 *Pieris* 广泛分布于中国大部分地区。其幼虫——菜青虫, 为害十字花科、菊科、旋花科、百合科、茄科、藜科和苋科等 9 科 35 种植物 (李云瑞, 2006) 对十字花科蔬菜, 如芥蓝、甘蓝、油菜、花椰菜的危害尤为严重。目前该种蝶类的研究主要集中于形态学、显微技术、生态毒理、电生理研究、同工酶以及系统发生等方面 (Kin et al. 1988; 王见杨和黄可威, 2001; Cristian et al. 2002; 郭晓霞和郑哲民, 2002; 侯天德等, 2005; Cernuti et al. 2007; 许丽等, 2007; 翟兴礼和杨霞, 2008; Jigar et al. 2009) 而利用分子遗传标记开展菜粉蝶不同地理种群遗传分化及系统地理学的研究鲜有报道。

利用分子生物学技术研究不同地区菜粉蝶种群的遗传学关系, 可以探索各地菜粉蝶种群在数量和空间上的内在联系, 从而为制定菜粉蝶在不同地区的区域性控制方法及菜青虫的病虫害防治提供科学依据。ITS-1 序列是 nrDNA 上位于 18S 与 5.8S rDNA 之间的序列, 由于其不参与核糖体的形成, 受自然选择的压力较小, 进化速率较快, 因此是研究种间和种内分子进化、系统发育以及种群遗传多样性分析的最常用的基因之一 (Schilthuizen et al. 1995; 唐伯平等, 2002; Arnette and Victor 2004)。

本研究尝试运用 DNA 克隆测序法对我国 16 个不同地理种群共 79 个个体的菜粉蝶 nrDNA ITS-1 序列进行测定和比较分析, 并运用系统发生分析软件重建其系统发生树, 初步探讨该种蝶类在我国的建群历史及其随后的系统地理学分化格局, 以期为我国菜粉蝶的遗传分化状况和今后的系统地理学及相关的应用研究提供部分基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

材料来源和采集时间见表 1。本实验所用标本经鉴定后立即放入 95% 的酒精中固定, 带回实验室放入冰箱中 -20°C 保存。

1.2 基因组 DNA 的提取、ITS-1 序列的扩增和测定

基因组 DNA 采用试剂盒 DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) 提取, 所用引物参考 Ji 等 (2003) 设计的 1 对引物: ITS-1A 5'-TACACACCGCCCGCTCG

CTACTA-3'; ITS-1B 5'-ATGTGCGTTCRAAATGTCGAT GTCA-3'。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

PCR 扩增体系共 $50\ \mu\text{L}$, 其中含基因组 DNA 约 $0.5\ \text{ng}$ 。PCR 反应程序常规; PCR 产物采用 TRANSGEN 的 pEASY-T3 试剂盒进行克隆测序, 测序工作由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.3 序列处理和系统分析

用 BioEdit 7.0 (Hall 1999) 将实验克隆后测出的序列进行拼接, 并辅以手工校正。在 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上确定菜粉蝶的 ITS-1 序列的边界及长度。用 Clustal X 1.8 软件 (Thompson et al. 1997) 进行序列比对。核酸序列变异及单倍型分析使用 DnaSP 5.0 (Librado and Rozas 2009)。以东方菜粉蝶为外群, 用 MEGA 4.0 软件 (Tamura et al. 2007) 的邻接法 (neighbor joining NJ) 和最小进化法 (minimum evolution ME) 重建不同单倍型之间的系统发生树。采用 Treeview 软件 (Roderic and Edward 1998) 显示拓扑结构图, 利用 Arlequin 3.11 软件 (Schneider et al. 2007) 的分子方差法 (AMOVA) 分析种群间的遗传多样性及分化程度。

2 结果与分析

2.1 ITS-1 序列组成及其遗传多样性参数

本研究选择齐齐哈尔的菜粉蝶和西安的东方菜粉蝶进行双向克隆测序, 所得结果用 BioEdit 7.0 进行拼接, 辅以手工校正。并在 GenBank 上确定其 ITS-1 序列的边界及长度, 其他地区的样品与之对照。选择 16 地区测序较好的 79 条 ITS-1 序列进行分析 (表 2), 结果表明: ITS-1 序列长度在 337 ~ 458 bp 之间, 其中福建三明 (FJ) 菜粉蝶 ITS-1 序列最短, 辽宁铁岭 (TL) 的菜粉蝶序列最长, 而外群辽宁新城 (XC) 东方菜粉蝶仅为 268 bp 陕西西安 (XA) 东方菜粉蝶却为 361 bp 与不同地理种群的菜粉蝶有明显差异, 其中北京 (BJ)、浙江椒江大陈岛 (DCD)、贵州贵阳 (GY)、湖北神农架酒壶坪 (HEB)、安徽芜湖 (WH) 和山西五台山 (WTS) 6 个地区的菜粉蝶所测个体之间的序列长度完全一致, ITS-1 序列呈现较高的稳定性 (表 2), 而辽宁铁岭 (TL) 的菜粉蝶序列间长度差异最大, 高达 102 bp 除此之外, 其他地理种群间菜粉蝶序列的差异很小, 仅为 1~4 bp 序列经 ClustalX 1.8 多重比对

表 1 本研究使用的菜粉蝶地理种群样本和 ITS-1 序列信息

Table 1 Different *Pieris rapae* population samples and the GenBank accession numbers of their ITS-1 sequences in this study

种群代码 Population code	采集地点 Sampling location	采集时间 Collecting date	经度 Longitude	纬度 Latitude	个体数 Number of individuals	个体代码 Individual code	GenBank 登录号 GenBank accession no
WH	安徽芜湖 Wuhu Anhui	2008. 5	118. 42	31. 33	6	WH1	GU319925
						WH2	GU319931
						WH3	GU319924
						WH4	GU319931
						WH5	GU319926
						WH6	GU319927
BJ	北京王家园 Wangjiayuan Beijing	2009. 4	116. 4	39. 88	6	BJ1	GU319889
						BJ2	GU319889
						BJ3	GU319889
						BJ4	GU319889
						BJ5	GU319889
						BJ6	GU319888
FJ	福建三明 Saming Fujian	2007. 6	117. 63	26. 26	6	FJ1	GU319926
						FJ2	GU319900
						FJ3	GU319901
						FJ4	GU319931
						FJ5	GU319931
						FJ6	GU319931
GS	甘肃徽县 Huixian Gansu	2007. 6	106. 11	33. 78	4	GS1	GU319904
						GS2	GU319935
						GS3	GU319902
						GS4	GU319903
GL	广西桂林 Guilin Guangxi	2008. 8	110. 29	25. 25	5	GL1	GU319909
						GL2	GU319908
						GL3	GU319909
						GL4	GU319907
						GL5	GU319931
GY	贵州贵阳 Guiyang Guizhou	2008. 8	106. 66	26. 63	5	GY1	GU319906
						GY2	GU319934
						GY3	GU319905
						GY4	GU319934
						GY5	GU319934
QQHE	黑龙江齐齐哈尔 Qiqihaer Heilongjiang	2007. 7	123. 82	47. 35	3	QQHE1	GU319918
						QQHE2	GU319918
						QQHE3	GU319918
HUB	湖北神农架(九冲) Shennongjia (Jiuchong), Hubei	1998. 7	112. 21	31. 02	4	HUB1	GU319913
						HUB2	GU319934
						HUB3	GU319913
						HUB4	GU319912

续表 1 Table 1 continued

种群代码 Population code	采集地点 Sampling Location	采集时间 Collecting date	经度 Longitude	纬度 Latitude	个体数 Number of individuals	个体代码 Individual code	GenBank 登录号 GenBank accession no
HEB	湖北神农架(酒壶坪) Shemongjia (Jiuhuping), Hubei	1998. 7	112. 21	31. 02	4	HEB1	GU319917
						HEB2	GU319915
						HEB3	GU319916
						HEB4	GU319914
DL	辽宁大连 Dalian Liaoning	2008. 8	121. 62	38. 9	4	DL1	GU319899
						DL2	GU319934
						DL3	GU319898
						DL4	GU319897
TL	辽宁铁岭 Tieling Liaoning	2008. 7	123. 82	42. 27	6	TL1	GU319922
						TL2	GU319922
						TL3	GU319921
						TL4	GU319920
						TL5	GU319923
						TL6	GU319919
HHHT	内蒙古呼和浩特 Huhehaote Inner Mongolia	2008. 8	111. 74	40. 83	6	HHHT1	GU319934
						HHHT2	GU319910
						HHHT3	GU319934
						HHHT4	GU319910
						HHHT5	GU319911
						HHHT6	GU319910
CF	内蒙古赤峰 Chifeng Inner Mongolia	2008. 8	118. 9	42. 24	6	CF1	GU319891
						CF2	GU319890
						CF3	GU319892
						CF4	GU319893
						CF5	GU319894
						CF6	GU319910
WTS	山西五台山 Wutaishan Shanxi	2008. 8	113. 32	38. 72	3	WTS1	GU319929
						WTS2	GU319930
						WTS3	GU319928
YN	云南昆明 Kunming Yunnan	2009. 4	102. 74	25. 02	6	YN1	GU319931
						YN2	GU319932
						YN3	GU319935
						YN4	GU319934
						YN5	GU319933
						YN6	GU319934
DCD	浙江台州 Taizhou Zhejiang	2008. 7	121. 44	28. 67	5	DCD1	GU319896
						DCD2	GU319934
						DCD3	GU319934
						DCD4	GU319895
						DCD5	GU319934
XC	辽宁兴城 Xingcheng Liaoning	2008. 8	120. 73	40. 61	5	XC1	GU319939
						XC2	GU319937
						XC3	GU319938
						XC4	GU319940
						XC5	GU319941
XA	陕西西安 Xi'an Shaanxi	2007. 7	108. 95	34. 25	3	XA1	GU319936
						XA2	GU319936
						XA3	GU319936

后,发现部分地理种群内和种群间序列相同,其中北京(BJ)、浙江大陈岛(DCD)、湖北神农架(HEB、HUB)、黑龙江齐齐哈尔(QQHE)、辽宁铁岭(TL)、广西桂林(GL)的种群内部分序列相同;而福建三明(FJ)、贵州贵阳(GY)、内蒙古呼和浩特(HHHT)、内蒙古赤峰(CF)、安徽芜湖(WH)、甘肃徽县(GS)等地理种群间部分个体序列却存在相同性(表3)。经MEGA 4.0软件分析后,在347个序列比对位点中有281个碱基序列为保守位点(conserved sites),变异位点(variable sites)63个,简约信息位点(parsinonious informative sites)16个和47个单突变位点(singleton sites)。经DnaSP 5.0软件分析,其核酸多态性指数(nucleotide diversity) P_i 为0.014,每位点Theta(per site) $\text{Eta}=0.041$,共检测出48个单倍型(haplotype)序列,单倍型多样性(haplotype diversity)频率为0.989,其中共享单倍型共3种:其中DL2、YN6、YN4、DCD2、DCD3、DCD5、GY2、GY4、GY5、HHHT1、HHHT3和HUB2为第一共享单倍型(记作HapI);YN1、WH2、WH4、GL5、FJ4、FJ5和FJ6为第二共享单倍型(记作HapII);QQHE1、QQHE2和QQHE3为第三共享单倍型(记作HapIII)。而独享单倍型所占的比率以及分布频率都比较高,各种群独享单倍型的存在及分布表明这些地理种群之间已呈现出一定程度的遗传分化。

用MEGA(version 4.0)软件对16个种群的菜粉蝶的碱基(T、C、A和G)组成作了计算,发现其碱基组成差异不大,79个个体的T、C、A和G的平均含量分别为33.0%、20.6%、25.6%和20.8%。G+C的含量明显低于A+T的含量。

表2 菜粉蝶与东方菜粉蝶 ITS-1序列长度

Table 2 The nuclear ITS-1 sequence sizes of *Pieris rapae* Linnaeus and *P. canidia* Sparman

种群	序列长度(bp)	种群	序列长度(bp)
Population	Sequence length	Population	Sequence length
BJ	340(6)	HUB	339(3), 340(1)
CF	339(1), 340(5)	HHHT	339(2), 340(4)
DCD	343(5)	QQHE	341(1), 342(2)
DL	382(2), 342(2)	TL	356(3), 357(1), 458(2)
FJ	337(1), 338(1), 339(4)	WH	340(6)
GL	342(2), 343(3)	WTS	340(3)
GS	338(1), 339(3)	YN	337(1), 339(4), 340(1)
GY	339(5)	XC	266(1), 267(1), 268(2), 272(1)
HEB	339(5)	XA	356(1), 363(1), 364(1)

括号内数字表示序列个数。Figures in brackets denote the number of sequences

表3 菜粉蝶种群内和种群间具有相同 ITS-1序列的个体列表
Table 3 The list of individuals with the same ITS-1 sequences within and between populations of *Pieris rapae* Linnaeus

序号	个体数	个体代码
No	Number of individuals	Individual code
1	3	DCD2 DCD3 DCD5
2	6	GY2 GY4 GY5 HHHT1 HHHT3 HUB2
3	2	QQHE2 QQHE3
4	3	YN1 WH2 WH4
5	2	FJ4 FJ5
6	2	HUB1 HUB3
7	1	FJ4 WH5
8	2	GS2 YN3
9	2	TL1 TL2
10	2	GL2 GL4
11	6	BJ1 BJ2 BJ3 BJ4 BJ5 BJ6
12	4	CF6 HHHT2 HHHT4 HHHT6

2.2 种群间 ITS-1序列的遗传距离

本研究采用 AMOVA 软件对菜粉蝶的单倍型(haplotype)数据进行分析,结果显示,其单倍型多样性为0~1.5之间,平均为0.989,其中浙江大陈岛(DCD)、福建三明(FJ)、贵州贵阳(GY)、北京(BJ)、内蒙古呼和浩特(HHHT)和湖北神农架九冲(HUB)值最高,为0.5~1.5;而黑龙江齐齐哈尔(QQHE)最低;其核苷酸多样性为0~0.96之间,平均为0.014,其中湖北神农架酒壶坪(HEB)值最高,为0.2~0.96之间,QQHE最低;平均核苷酸差异数最高和最低的种群分别为湖北神农架酒壶坪(HEB)和黑龙江齐齐哈尔(QQHE)(表4)。

结果还显示:菜粉蝶的平均遗传分化距离为0.351($P<0.05$),其种群内和不同种群间均有较高的遗传变异。但总的来说,变异主要来源于种群内(占总变异的64.93%),其种群间和种群内的遗传分化指数(F_{ST})见表5。

2.3 聚类分析

以西安(XA)和辽宁兴城(XC)的东方菜粉蝶为外群,分别以邻接法(NJ树)、最小进化法(ME)构建了16个地理种群共48个不同单倍型的系统进化树,重复1000次抽样估算系统树上各分枝的自引导值。结果显示两种树的拓扑结构基本一致,现以NJ树为例说明(图1):各地理种群均具有较高的单倍型多样性,且同一种群的不同单倍型之间有一定的分歧,形成不同的簇类关系,其中大陈岛(DCD)、桂林(GL)、云南(YN)和湖北神农架九冲(HUB)变异最为明显。其中,北京(BJ)、呼和浩特

表 4 菜粉蝶不同地理种群的基因单倍型、核苷酸多样性、Tajima's D 中性检验及平均核苷酸差异数

Table 4 The haplotype diversity nucleotide diversity Tajima's D neutrality test and mean number of pairwise nucleotide difference of *Pieris rapae* populations in this study

种群 Population	单倍型多样性 Haplotype diversity (Hd)	核苷酸多样性 Nucleotide diversity (π)	Tajima's D	平均核苷酸差异数 Mean number of pairwise difference
DL	1.0000 ± 0.2722	0.015595 ± 0.012865	0.00000	2.66667
HEB	1.0000 ± 0.1768	0.0581952 ± 0.380973	1.43823	182.33333
WTS	1.0000 ± 0.2722	0.005900 ± 0.005562	0.00000	2
GS	1.0000 ± 0.2722	0.011799 ± 0.010028	0.00000	3.33333
YN	0.7576 ± 0.0927	0.006818 ± 0.004510	-0.64365	1.65152
DCD	1.0000 ± 0.5000	0.011628 ± 0.013000	0.00000	4
GL	1.0000 ± 0.2722	0.019380 ± 0.015691	0.00000	5.33333
GY	1.0000 ± 0.5000	0.005900 ± 0.007226	0.00000	2
FJ	1.0000 ± 0.5000	0.014749 ± 0.016157	0.00000	4
TL	1.0000 ± 0.1265	0.0152174 ± 0.093039	-2.58268	7.2
WH	1.0000 ± 0.1768	0.010294 ± 0.007871	-0.06501	2.16667
QQHE	0.0000 ± 0.0000	0.000000 ± 0.000000	0.00000	0.00000
BJ	1.0000 ± 0.5000	0.002941 ± 0.004159	0.00000	1
HHHT	1.0000 ± 0.5000	0.008824 ± 0.010189	0.00000	3
HUB	1.0000 ± 0.5000	0.023460 ± 0.024884	0.00000	5
CF	1.0000 ± 0.1265	0.014118 ± 0.009687	-1.19955	4.4

表中 Hd 和 π 值为平均值 ± 标准差。The Hd and π values are mean ± SD

表 5 不同地理种群间菜粉蝶的遗传分化指数 (F_{ST}) 值Table 5 The F_{ST} values of the 16 *Pieris rapae* populations in this study

	DL	HEB	WTS	GS	YN	DCD	GL	GY	FJ	TL	WH	QQHE	BJ	HHHT	HUB	F_{ST}
DL																0.505
HEB	0.257															-1.10
WTS	0.450	0.254														0.528
GS	0.391	0.251	0.182													0.514
YN	0.550	0.606	0.218	0.222												0.520
DCD	0.606	0.139	0.676	0.571	0.669											0.521
GL	0.486	0.254	0.435	0.385	0.522	0.345										0.496
GY	0.352	0.116	0.143	0.032	0.105	0.625	0.327									0.532
FJ	0.410	0.119	0.357	0.250	0.434	0.571	0.384	0.222								0.516
TL	0.356	0.391	0.339	0.337	0.614	0.230	0.291	0.231	0.245							-0.043
WH	0.470	0.334	0.303	0.268	0.148	0.626	0.343	0.197	0.242	0.382						0.515
QQHE	0.719	0.129	0.842	0.721	0.738	0.857	0.597	0.878	0.762	0.263	0.693					0.542
BJ	0.678	0.123	0.789	0.667	0.702	0.783	0.478	0.786	0.700	0.238	0.640	0.933				0.537
HHHT	0.619	0.123	0.687	0.587	0.663	0.696	0.398	0.667	0.600	0.230	0.567	0.800	0.333			0.527
HUB	0.389	0.112	0.333	0.250	0.336	0.455	0.103	0.167	0.235	0.197	0.042	0.500	0.182	0.000		0.501
CF	0.588	0.391	0.539	0.507	0.577	0.616	0.421	0.479	0.529	0.436	0.477	0.582	0.185	0.059	0.096	0.502

最后一列为种群内 F_{ST} 值。The F_{ST} values in the last column show those within each population

(HHHT) 辽宁铁岭 (TL) 及赤峰 (CF) 种群之间具有较近的亲缘关系, 与其实际地理距离呈现出一定的相关性, 但是这些种群内的部分序列却也出现了一定的分化, 如 CF5 与 YN1 和 WH1 具有较高的同源性。

3 讨论

3.1 不同地理种群间的菜粉蝶的遗传分化

群体遗传结构是指遗传变异在物种或群体中的

一种非随机分布, 即遗传变异在群体内、群体间的分布样式以及在时间上的变化 (Hamrick and Loveless 1989)。这种非随机分布是由不同过程共同作用产生的, 包括物种长期的进化历史、分布区改变、生境破碎、群体隔离、突变、遗传漂变、繁育系统、基因流与选择等 (Slatkin 1987, 1995)。因此, 要阐明生物进化的过程、式样和机理, 必须首先探讨生物群体遗传变异大小、遗传结构及其变化规律以及影响群体遗传结

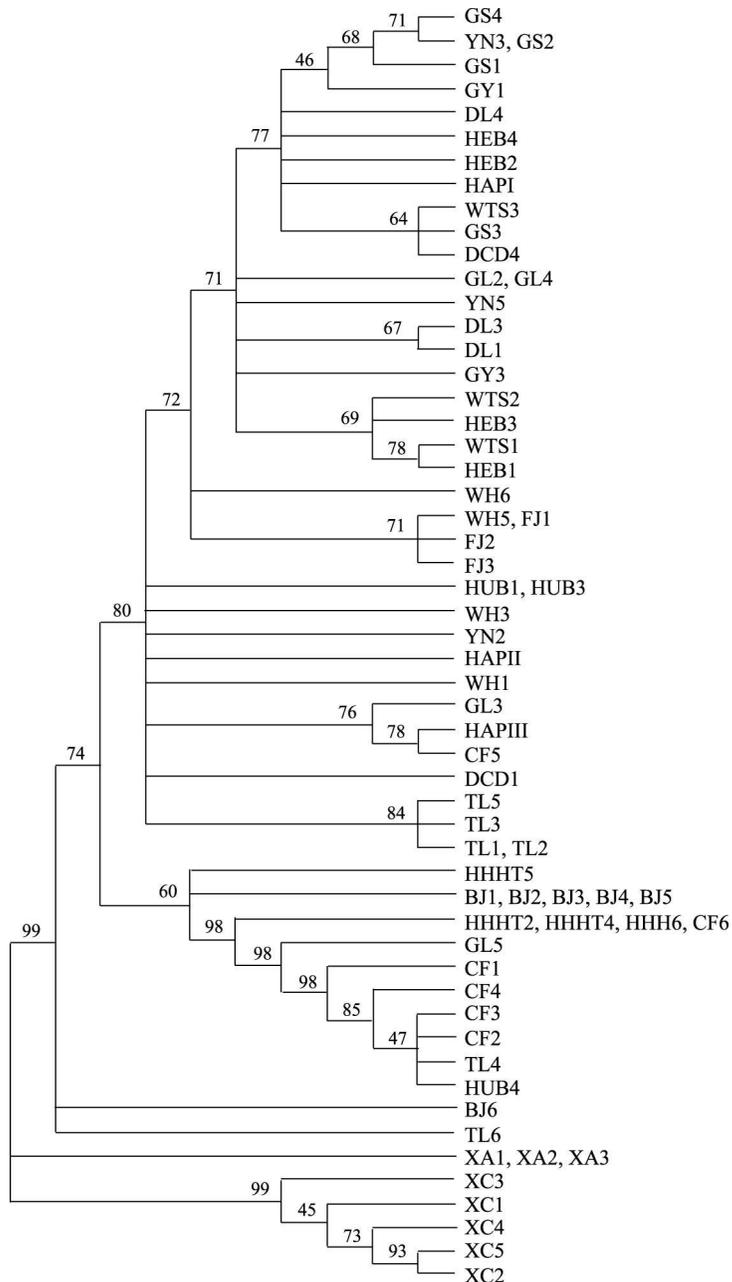


图 1 菜粉蝶 48 个 ITS-1 单倍型的 NJ 系统发生树 (以东方菜粉蝶为外群)

Fig 1 Neighbor-joining tree of the 48 *Pieris rapae* ITS-1 haplotypes using *P. canidia* as the outgroup

构的各种因素 (Hamrick, 1983)。

Wright (1978) 提出遗传分化指数 (F_{ST}) 介于 0 ~ 0.05 之间的种群遗传分化很弱, 介于 0.05 ~ 0.15 之间的种群遗传分化中等, 介于 0.15 ~ 0.25 之间的种群遗传分化很大, 大于 0.25 表明种群遗传分化极大。本研究表明: 菜粉蝶主要的遗传变异应来源于种群内, 各种群内的 F_{ST} 值一般在 0.5 左右。而种群间的情况比较复杂, 其中, 北京与黑龙江齐齐哈尔种群的遗传分化指数 (F_{ST}) 值最大, 高达 0.933; 黑龙江的齐齐哈尔与山西五台山、浙江椒

江大陈岛及贵州贵阳也高达 0.8 以上; 而湖北神农架酒壶坪与浙江大陈岛、贵州贵阳、福建三明、黑龙江齐齐哈尔、北京、内蒙古呼和浩特、湖北神农架九冲; 湖北神农架九冲与广西桂林、内蒙古赤峰和呼和浩特; 云南昆明与贵州贵阳、安徽芜湖以及内蒙古赤峰与呼和浩特的 F_{ST} 值皆小于 0.15; 另外湖北神农架九冲与内蒙古呼和浩特的 F_{ST} 值却仅为 0。除此之外, 辽宁大连和其他所有种群间; 湖北神农架酒壶坪与山西五台山、甘肃徽县、云南昆明、广西桂林等其他种群间的 F_{ST} 却大于 0.25。

总的来说, 莱粉蝶种群的遗传分化较为明显, 并且主要体现于种群内。其各地理种群间遗传差异形成的主要原因, 可能与人为因素导致的地理种群间基因流的有无和大小有关。同时, 本研究显示, 海拔高度是限制莱粉蝶的基因交流的一个重要因素, 如湖北神农架的九冲和酒壶坪处于明显不同的海拔高度, 从而对两地的莱粉蝶产生了明显的隔离作用。

物种的适应能力、生存能力和进化潜力与其遗传多样性高低密切相关, 一般而言, 单倍型间的核酸多态性指数 (nucleotide diversity) P_i 是衡量群体内变异程度的重要指标之一。对于大多数动物来说, P_i 值在 0.01 以上时被认为变异较大 (Neigel et al. 1993)。本实验显示, 莱粉蝶单倍型间的核酸多态性指数 P_i 为 0.014 也在一定程度上说明其主要种群间的遗传多样性较高。

Pashley (1986) 通过研究表明, 对植食性昆虫来说, 异域分布的昆虫产生种下分化是由地理和人为的双重作用决定的。随着栽培技术的发展和交通的便利, 莱粉蝶的寄主植物之间的交流日益频繁, 而莱粉蝶也随着寄主植物被带到不同的地区, 表现出基因型相似程度升高。同时研究也发现相同地域的莱粉蝶个体之间共享单倍型出现的机率相对较高, 而跨地域不同个体之间却也拥有相同的基因型, 单倍型的出现没有一定的规律可循。本研究的系统树拓扑结构显示, 不同种群间的系统发生格局与它们的地理分布之间没有明显的关联。如果排除人为因素, 仅靠莱粉蝶自身的迁移很难形成如此复杂的基因流。因而, 人为因素可能是影响莱粉蝶种群遗传结构和遗传多样性的重要因素。

莱粉蝶以十字花科 (Cruciferae) 为主要寄主植物, 尤其偏食厚叶片的甘蓝 *Brassica oleracea* L 类蔬菜, 有研究表明甘蓝类蔬菜起源于地中海沿岸, 多数学者认为其起源于现存的一种一年生杂草 *Brassica oleracea* var. *sylvestris* 也有人认为其起源于地中海地区 4 种野生近缘种的复合体 (王建林等, 2006)。甘蓝类蔬菜是从清朝年间开始逐步传入我国, 在我国的栽培历史还比较短 (刘英和王超, 2006), 而莱粉蝶的另外一种寄主植物——大白菜, 是中国土生土长的一种蔬菜。有研究表明: 美国的莱粉蝶传入是在 1620 年以后随十字花科植物由欧洲人带入的 (陈学新, 1997), 那么中国的莱粉蝶也可能是由甘蓝类蔬菜的输入而进入国内的。根据图 1 的结果推测, 莱粉蝶在中国的建群事件可能发生

于北京、内蒙古和辽宁铁岭附近。随着时间推移, 一部分向北蔓延, 到达齐齐哈尔等地; 一部分向西部、西南部扩张到了山西、甘肃、贵州、云南等地; 另一部分沿海延伸到沈阳、福建、浙江、安徽、广西等地。

3.2 ITS-1 序列在蝶类系统发育中的应用

莱粉蝶作为广布性有害昆虫, 其病虫害研究在生物学, 尤其在分子系统学方面的研究还很匮乏。本研究结果表明, 不同地理种群间的莱粉蝶 rDNA 的 ITS-1 序列遗传分化较大, 同时存在明显的种群内个体间变异。研究表明核 ITS 区为高变区, 是探讨种内种群间遗传分化和系统发生的有效分子标记, 同时也可作为相似种间快速鉴定的分子标记 (本研究中它可以较快鉴定形态上相似、较易混淆的莱粉蝶与东方莱粉蝶)。

本研究所采用的试验材料虽然涉及的地理范围很广, 但总体而言, 由于采样方式、采样条件、试验设备及研究时间等诸多因素的影响, 可能会对某些试验结果产生影响。为了更全面掌握莱粉蝶地理种群空间分布规律的内在联系, 有必要在今后的研究中进一步增加样品的数量和应用其他分子标记, 以期进一步佐证本研究的结果, 为莱粉蝶的区域性控制、病虫害防治及分子系统地理学研究提供更为全面的分子生物学数据。

致谢 感谢齐齐哈尔大学王守军硕士、西北师范大学龚大杰教授等在采集样本过程中提供的大力帮助以及安徽师范大学项贤领博士在数据处理上给予的悉心指导; 中国科学院动物研究所武春生研究员帮助鉴别部分标本, 并在成文过程中给予宝贵建议。

参考文献 (References)

- Annette W, Victor D 2004 Exploring the phylogenetic utility of ITS sequences for animals: a test case for *abalne* (Haliotis). *Journal of Molecular Evolution* 54(2): 246–257.
- Ceruti R, Raju R, Marshall W 2007 Evaluating spiders for their potential to control cabbage white butterflies (*Pieris rapae*). *Insect Pests* 5: 25–29
- Chen XX 1997 *Insect Biogeography*. Chinese Forestry Press, Beijing: 66–67 [陈学新, 1997. 昆虫生物地理学. 北京: 中国林业出版社. 66–67]
- Cristian A, Stefan S, Joo PJ 2002 Chemical polymorphism of the cuticular lipids of the cabbage white *Pieris rapae*. *Journal of Chemical Ecology* 11: 37–42
- Guo XX, Zheng ZM 2002 Studies on esterase isoenzyme of *Pieris rapae* at different developmental stages. *Acta Entomologica Sinica* 45(3): 401–403 [郭晓霞, 郑哲民, 2002. 莱粉蝶不同发育期酯酶同工酶的比较研究. 昆虫学报, 45(3): 401–403]

- Hall TA 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98
- Hannick JL 1983. Plant population genetics and evolution. *American Journal of Botany* 69: 1685–1693
- Hannick JL, Loveless MD 1989. Associations between the breeding system and the genetic structure of tropical tree populations. In: Bock J, Lihhart YB eds. *Evolutionary Ecology of Plants*. Westview Press, Boulder: 129–146
- Hou TD, He FY, Cheng F 2005. Electrical response of lamina ganglion in *Vanssa cardui* and *Pieris rapae* to light stimulation on compound eye. *Journal of Lanzhou University* 41(3): 45–47. [侯天德, 何福元, 程麟. 2005. 光刺激蛱蝶和菜粉蝶复眼引起的视神经节层电生理反应. 兰州大学学报, 41(3): 45–47]
- Ji YJ, Zhang DX, He LJ 2003. Evolutionary conservation and versatility of a new set of primers for amplifying the ribosomal internal transcribed spacer regions in insects and other invertebrates. *Molecular Ecology Notes* 3: 581–585
- Järger K, Metspalu L, Hiiesaar K, Plomii A, Svilponis E, Kuusk A, Men'shykova N, Kiminagi I, Luik A 2009. Influence of white cabbage cultivars on oviposition preference of the *Pieris rapae* L. (Lepidoptera: Pieridae). *Agronomy Research* 7: 283–288
- Kim HR, Ko YG, Mayer RT 1988. Purification, characterization and synthesis of vitellin from the cabbage butterfly *Pieris rapae* L. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 9: 67–79
- Li YR 2006. *Agricultural Entomology*. Higher Education Press, Beijing: 151–152. [李云瑞, 2006. 农业昆虫学. 北京: 高等教育出版社. 151–152]
- Librado P, Rozas J 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451–1452
- Liu Y, Wang G 2006. Origin, classification and evolution of Brassicaceae L. *Northern Horticulture* 2(4): 57. [刘英, 王超, 2006. 简述甘蓝类植物的起源及分类. 北方园艺, 2(4): 57]
- Neigel JE, Avise JC 1993. Application of random walk model to geographic distributions of animal mitochondrial DNA variation. *Genetics* 135(4): 1209–1220
- Pashley DP 1986. Host-associated genetic differentiation in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae): a sibling species complex? *Annals of the Entomological Society of America* 79(6): 898–904
- Roderic DM, Edward CH 1998. *Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach*. Blackwell Science Press, USA: 123–125
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L 2007. Arlequin ver 3.11: a software for population genetics data analysis. University Geneva, Geneva (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>).
- Schilthuizen M, Gittenberger E, Gultyaev AP 1995. Phylogenetic relationships inferred from the sequence and secondary structure of ITS1 rRNA in *Albinaria* and putative *Isabellaria* species (Gastropoda: Pulmonata: Clausiliidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 4(4): 457–462
- Slatkin M 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236: 787–792
- Slatkin M 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139(1): 457–462
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S 2007. MEGA 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24(8): 1596–1599
- Tang BR, Zhou KY, Song DX 2002. Application of sequences of mtDNA ITS to molecular systematics of invertebrates. *Chinese Journal of Zoology* 37(4): 67–73. [唐伯平, 周开亚, 宋大祥, 2002. 核 rDNA ITS 区序列在无脊椎动物分子系统学研究中的应用. 动物学报, 37(4): 67–73]
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25(24): 4876–4882
- Wang JL, Luan YF, Dacizhuoga, Chang TJ 2006. A study on geographical distribution of Cruciferae in China. *Journal of Plant Resources and Environment* 15(3): 7–11. [王建林, 栾运芳, 大次卓嘎, 常天军, 2006. 中国十字花科 (Cruciferae) 的地理分布. 植物资源与环境学报, 15(3): 7–11]
- Wang JY, Huang KW 2001. Studies on the ribosomal RNA gene (rDNA) of a microsporidium isolated from *Pieris rapae* L. *Acta Microbiologica Sinica* 41(5): 598–604. [王见杨, 黄可威, 2001. 菜粉蝶微孢子虫核糖体 RNA (rRNA) 编码基因的研究. 微生物学报, 41(5): 598–604]
- Wright S 1978. *Evolution and the Genetics of Populations: Volume 4. Variability Within and Among Natural Populations*. The University of Chicago Press, Chicago: 325–327
- Xu L, Hao JS, Zhu GP, Yin XB, Pan HG, Huang DY, Zhang XP 2007. Molecular phylogenetic relationships of some species and genera in Pierinae and Coliadinae (Pieridae) based on partial sequence of mitochondrial COI and Cytb genes. *Acta Zootaxonomica Sinica* 32(4): 842–850. [许丽, 郝家胜, 朱国萍, 殷先兵, 潘鸿春, 黄敦元, 张小平, 2007. 基于线粒体 COI 和 Cytb 基因的粉蝶亚科及黄粉蝶亚科 (粉蝶科) 部分类群的分子系统发生. 动物分类学报, 32(4): 842–850]
- Zhai XL, Yang X 2008. Study on fatality of extract concentration of *Melia azedarach* L. against cabbage caterpillar and diamondback moth. *Journal of Henan Agricultural Sciences* 7: 70–71. [翟兴礼, 杨霞, 2008. 苦楝果实甲醇提取液对菜青虫、小菜蛾致死活性研究. 河南农业科学, 7: 70–71]

(责任编辑: 袁德成)