

假眼小绿叶蝉地理种群的线粒体 DNA 16S rRNA 基因序列分析及遗传分化研究^{*}

李 乐^{**} 付建玉 肖 强^{***}

(中国农业科学院茶叶研究所 杭州 310008)

摘 要 测定了 12 个不同地理种群的茶树害虫假眼小绿叶蝉 *Empoasca vitis* (Gothe) 和 1 个外群共 103 个个体的线粒体 DNA 16S rRNA 基因部分序列, 比较其同源性, 计算核苷酸组成, 并构建单倍型进化关系图。结果表明: 在获得的假眼小绿叶蝉 536 bp 的序列中 A + T 含量占 76.8%, 其中 56 个核苷酸位点存在变异; 100 个个体共检测出 56 种单倍型, 单倍型多样性指数 (H) 为 0.971, 核苷酸多样性指数 (Pi) 0.006; 12 个种群间的平均基因流 (Nm) 为 1.64。总群体的固定系数 Fst 为 0.026; AMOVA 分子方差分析结果表明假眼小绿叶蝉的遗传分化主要来自于种群内部 (97.4%)。各地理种群的遗传距离与地理分布不具有直接对应的关系。根据构建的单倍型进化关系网, 各地理种群的单倍型呈现一种混杂的分布格局, 未显示出与地理分布的一致性。

关键词 茶树, 假眼小绿叶蝉, 地理种群, 线粒体 16S rRNA, 遗传分化

Sequence analysis of the mtDNA gene and genetic differentiation in geographic populations of *Empoasca vitis*

LI Le^{**} FU Jian-Yu XIAO Qiang^{***}

(Tea Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310008, China)

Abstract Mitochondrial DNA 16S rRNA gene sequences were sequenced in 103 individuals of *Empoasca vitis* (Gothe) from 12 different geographical populations, including an outgroup species (*Erythroneura sudra* Distant). We compared the homologous sequences of all the individuals, and then calculated nucleotide composition. A median-joining network was constructed using Network 4500. Through sequential analyses, we observed that the value of A + T was about 76.8% and 56 nucleotide sites were substituted in the 536 bp fragment of *E. vitis*. 56 haplotypes were detected in 100 individuals. Haplotype diversity index (H) and mean nucleotide diversity index (Pi) reached 0.971 and 0.006 respectively. The gene flow (Nm) among the 12 populations was 1.64. The overall Fst value was 0.026. Molecular variance (AMOVA) analysis indicated that a high proportion of the total genetic variance was attributable to variation within populations (97.4%). The median-joining network of the 56 haplotypes did not clearly resolve the 12-location groupings of haplotypes and did not correspond to every geographic group of *E. vitis*.

Key words tea tree, *Empoasca vitis*, geographic population, mitochondrial 16S rRNA, genetic differentiation

假眼小绿叶蝉 *Empoasca vitis* (Gothe) 属半翅目叶蝉科 (Hemiptera: Cicadellidae), 是我国茶园最主要的害虫。其成虫、若虫均以针状口器刺吸茶树嫩梢芽叶的汁液, 受害芽叶叶缘泛黄, 叶脉变红, 进而对夏、秋茶的产量和品质产生较大影响

(董文霞和韩宝瑜, 2004)。一直以来, 我国茶园叶蝉按传统的形态特征进行分类并确定优势种的归属。葛钟麟和张汉鹄 (1988) 提出危害种应为假眼小绿叶蝉并确定其学名 *Empoasca* (*Empoasca*) *vitis* (Gothe), 但在各种研究论文和书籍中, 茶树小绿

^{*} 资助项目: 科技基础性工作专项 (2008FY210500); 国家科技支撑计划课题 (2011BAD01B02)。

^{**} E-mail: doramilee@163.com

^{***} 通讯作者, E-mail: xqtea@vip.163.com

收稿日期: 2012-02-02, 接受日期: 2012-04-17

叶蝉的种名仍有多种提法,存在多个拉丁学名(陈银方,1992;戴轩,1992;章士美和赵泳祥,1996;Hu,1997)。

线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 基因组构成清楚,结构相对稳定,具有高拷贝数量、严格遵守母系遗传、进化速率快、基因顺序和组成保守性高等优点,同时 mtDNA 属于细胞器基因组,缺乏细胞核基因组中的保护机制,因而变异较为明显能够反映较短时间内的进化事件,已成为研究昆虫系统发育、种群遗传变异和分化、近缘种和种下分类单元鉴定等最为广泛的遗传标记之一(Lunt *et al.*, 1998; Shufan *et al.*, 2000; Smith, 2005; Zanol *et al.*, 2010)。目前,应用于系统进化研究中最多的分子标记基因有细胞色素氧化酶 I (cytochrome oxidase I gene, CO I)、16S rRNA 和 12S rRNA 基因。其中 mtDNA 16S rRNA 在无脊椎动物种内的遗传变异研究中已经得到了广泛应用。有研究发现利用 16S rRNA 基因能有效鉴定烟粉虱的生物型;新疆境内东、西部地区的意大利蝗虫不同地理种群的 mtDNA 16S rRNA 存在一定程度的遗传分化;美菲对虾个体间的 mtDNA 16S rRNA 核苷酸碱基存在丰富的变异(Machado *et al.*, 1993; 程虹等, 2010; 沈媛等, 2010)。

目前国内对假眼小绿叶蝉研究主要集中在生活史、发生规律和防治策略等方面,近年来也有应用 RAPD 标记来研究茶树小绿叶蝉的优势种归属、亲缘关系和地理分化的相关报道(付建玉和韩宝瑜, 2005, 2007), 应用 mtDNA 作为分子标记来研究假眼小绿叶蝉的遗传状况尚未见报道。

本研究以假眼小绿叶蝉的线粒体内 16S rRNA 基因作为分子标记,测定了全国 12 个不同地理种群假眼小绿叶蝉线粒体 16S rRNA 基因部分序列并用桃一点斑叶蝉 *Erythroneura sudra* (Distant) 作外群,构建分子系统树,以期从分子水平获得它们的系统进化关系,并为其利用和防治提供分子生物学方面依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

本试验所用虫源分别采自安徽宣城、江苏无锡、湖南长沙、海南儋州、浙江杭州、山东青岛、重庆永川、湖北恩施、广西桂林、福建福安、广东英

德、云南西双版纳(表 1)。各地理种群均采用假眼小绿叶蝉成虫或若虫。用无水乙醇浸泡, -20℃ 保存备用。

1.2 基因组 DNA 的提取

取保存在无水乙醇中的单个假眼小绿叶蝉虫体,基因组 DNA 提取采用苯酚/氯仿抽提法(付建玉和韩宝瑜, 2005)。

1.3 PCR 扩增

PCR 扩增的上游、下游引物分别为:

5'-CCGGTYTGAAGTCAATCAWGT-3'

5'-CTGTTTAWCAAAAACATTTTC-3'

PCR 扩增反应总体系 25 μ L, 1 μ L 模板 DNA, 0.3 μ L *Taq* DNA 聚合酶(5U), 2.5 μ L PCR 10 $\times$ buffer(Mg²⁺), 2 μ L dNTP(2.5 mmol/L), 0.1 μ L 16S_F(10 mmol/L), 0.1 μ L 16S_R(10 mmol/L), 加去离子水至 25 μ L。扩增反应条件为:94℃ 预变性 3 min;94℃ 变性 30 s, 50℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环, 72℃ 再延伸 10 min。

1.4 基因克隆与序列测定

扩增产物经含有溴化乙锭(EB)的 1% 琼脂糖电泳检测后用凝胶回收试剂盒回收,经 T/A 克隆法连接至 pGEM-T Easy Vector,再用 CaCl₂ 法转化至大肠杆菌 TG1 中,在含有 Amp/X-gal/IPTG 的 LB 固体培养基上 37℃ 过夜培养,随机挑取白色单克隆,利用 M13 载体通用引物检测筛选阳性克隆,并送至专业生物公司双向测序以保证测序结果的可靠性。

1.5 DNA 序列数据的处理

使用 ClustalX 1.83 软件对所得假眼小绿叶蝉线粒体 16S rRNA 基因序列进行多序列同源对比,并辅以人工校对。应用软件 DnaSP 5.0 (Librado and Rozas, 2009) 计算种群核苷酸多样性,并进行中性检验。通过 MEGA 4.1 (Tamura *et al.*, 2007) 基于 Kimura 2-Parameter(K2P)模型计算种群间的遗传距离。中性进化检验采用 Tajima's *D* (Tajima, 1989) 和 Fu 的 *F_s* (Fu, 1997) 检验。采用 Network 4500 软件 (Polzin and Daneschm, 2003) 绘制单倍型间的进化网络图。利用 Arlequin3.11 (Excoffier *et al.*, 2005) 软件对种群进行分子变异分析 (AMOVA)。

表 1 假眼小绿叶蝉地理种群采集信息及供试个体数
Table 1 Collecting data and number of assayed individuals of *Empoasca vitis* in this study

采集地点 Sampling location	种群代码 Population code	地理坐标 Geo-coordinates	采集时间 Collection data	分析个数 Number of individuals assayed
重庆永川 Yongchuan Chongqing	CQ-YC	29°21′N,105°53′E	2010. 07	9
江苏无锡 Wuxi Jiangsu	JS-WX	31°34′N,120°13′E	2010. 08	8
海南儋州 Danzhou Hainan	HN-DZ	19°30′N,109°29′E	2010. 08	8
福建福州 Fuzhou Fujian	FJ-FZ	26°05′N,119°13′E	2010. 07	8
湖北恩施 Enshi Hubei	HB-ES	30°17′N,109°29′E	2010. 07	7
云南西双版纳 Xishuangbanna Yunnan	YN-XSBN	21°59′N,100°25′E	2010. 09	7
广东英德 Yingde Guangdong	GD-YD	24°12′N,113°24′E	2010. 07	8
湖南长沙 Changsha Hunan	HN-CS	28°12′N,113°04′E	2010. 08	10
山东青岛 Qingdao Shandong	SD-QD	36°12′N,120°35′E	2010. 10	9
浙江杭州 Hangzhou Zhejiang	ZJ-HZ	30°10′N,120°05′E	2010. 04	7
广西桂林 Guilin Guangxi	GX-GL	25°17′N,110°21′E	2010. 10	11
安徽宣城 Xuancheng Anhui	AH-XC	30°58′N,119°08′E	2010. 06	8

2 结果与分析

2.1 假眼小绿叶蝉线粒体 16S rRNA 序列特征及变异

采用假眼小绿叶蝉 100 个个体的线粒体 16S rRNA 基因部分序列进行 PCR 扩增,均获得了特异性很好的 PCR 产物。经序列测定,获得的 mtDNA 16S rRNA 序列的片段大小为 536 bp(包含引物序列),利用 MEGA4.1 软件统计出假眼小绿叶蝉 16S rRNA 基因在供试种群中保守位点(C)479 个,变异位点(V)56 个,简约信息位点(Pi)10 个,自裔位点(Si)46 个。在这 56 个变异位点中,有 54 个位点属于两碱基变异(two variants),仅有 2 个位点含有三碱基变异(three variants),转换位点共 41 个,颠换位点 14 个,另有 1 个位点(nt205,即第 205 号核苷酸位点)即出现转换也出现颠换。该基

因片段序列中碱基 T 的含量为 32.7%,C 的含量为 14.7%,A 的含量为 43.1%,G 的含量为 9.5%,A + T 含量(76.8%)显著高于 G + C 的含量。分析 56 种单倍型在 12 个群体中的分布,结果显示,共享型单倍型为 18%(10/56),其中,H9 和 H51 分布广泛,可能是原始单倍型。H9 分布于 7 个群体中,共有 10 个个体表现为 H1;H51 分布于 6 个群体中,共有 9 个个体表现为 H51。45 种单倍型存在于单个群体中(表 2,表 3)。

2.2 假眼小绿叶蝉种群遗传多样性分析

假眼小绿叶蝉 12 个地理种群 16S rRNA 基因部分序列比较后得出,12 个地理种群间存在一定的遗传差异。遗传参数统计表明(表 4),各种群多态性位点数在 5 ~ 15 之间;各地理种群内的单倍型多样性水平比较高,单倍型多样性指数在

表 2 假眼小绿叶蝉 16S rRNA 基因序列单倍型及在群体中的分布
Table 2 Haplotypes of 16S rRNA and their distribution in 12 population of *Empoasca vitis*

单倍型 Haplotype	变异发生位点 Sequence variations and corresponding sites																																		
	6	1	1	2	2	2	7	8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3				
	0	5	0	4	9	3	4	3	5	9	0	0	8	0	3	9	4	8	5	3	5	7	5	8	6	4	5	6	7	9	0	6	9		
H1	T	A	G	A	A	A	T	C	A	A	T	A	A	A	T	G	A	T	A	A	A	A	T	A	C	G	T	T	A	A	T	A	A		
H1	T	A	G	A	A	A	T	C	A	A	T	A	A	A	T	G	A	T	A	A	A	A	T	A	C	G	T	T	A	A	T	A	A		
H2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
H4	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
H7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.		
H8	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H9	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H10	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H11	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H12	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
H13	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H14	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	
H15	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H16	C	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H17	C	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H18	C	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	
H19	C	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H20	C	.	A	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	
H21	.	.	A	T	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H22	C	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	
H23	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H24	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H25	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H26	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H27	.	.	A	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H28	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H29	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H30	C	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H31	C	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H32	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H33	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	
H34	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	
H35	C	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H36	C	G	.	T	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H37	C	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	
H38	C	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H39	C	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H40	C	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H41	C	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H42	C	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H43	C	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	G	.	.	.	.	.	.	
H44	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H45	.	.	A	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H46	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H47	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H48	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H49	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H50	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	T	.	.	.	.	.	
H51	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H52	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H53	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H54	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H55	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H56	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	T	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	

续表 2 (Table 2 continued)

单倍型 Haplotype		变异发生位点 Sequence variations and corresponding sites																					
		3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	
		5	5	6	8	8	1	4	4	4	5	5	6	6	8	8	8	0	0	0	0	1	2
		4	9	8	8	9	2	4	6	9	1	3	6	9	2	5	8	1	7	8	9	3	8
H1		A	G	A	A	C	T	T	T	A	A	T	G	A	T	G	A	A	A	A	T	A	T
H2		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H3		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H4		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H5		G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H6		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H7		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H8		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H9		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H10		.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H11		.	.	.	G	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H12		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
H13		.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H14		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H15		.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H16		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H17		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H18		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H19		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H20		.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	A	.
H21		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.
H22		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.
H23		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
H24		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
H25		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
H26		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
H27		.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
H28		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
H29		.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
H30		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
H31		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
H32		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
H33		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	A	.
H34		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
H35		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H36		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H37		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H38		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H39		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H40		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.
H41		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H42		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.
H43		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H44		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H45		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H46		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H47		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.
H48		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H49		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H50		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H51		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H52		.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H53		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H54		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.
H55		.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.
H56		.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	G	.	.	.

Table 3 Haplotypes and GenBank accession numbers of 16S rRNA gene sequences of *Empoasca vitis*

单倍型 Haplotype	群体名称 Population name													GenBank 登 录 号
	CQ	JS	HN	FJ	HB	YN	GD	HN	SD	ZJ	GX	AH	GenBank	
	YC	WX	DZ	FZ	ES	XS	YD	CS	QD	HZ	GL	XC	accession number	
						BN								
H1	1												JQ886736	
H2		1											JQ886737	
H3			1										JQ886738	
H4				1									JQ886739	
H5					1								JQ886740	
H6	1	1					1	1	1	1			JQ886741	
H7						1							JQ886742	
H8							1						JQ886743	
H9	1	1		1		4	1			1	1		JQ886744	
H10											1		JQ886745	
H11				1									JQ886746	
H12								1					JQ886747	
H13											1		JQ886748	
H14											1		JQ886749	
H15							1						JQ886750	
H16	1					1						1	JQ886751	
H17				1									JQ886752	
H18								1					JQ886753	
H19					1								JQ886754	
H20					1								JQ886755	
H21	1		2					1					JQ886756	
H22								1					JQ886757	
H23			2				1		1				JQ886758	
H24						1							JQ886759	
H25					1								JQ886760	
H26							1						JQ886761	
H27									1				JQ886762	
H28							1						JQ886763	
H29								1					JQ886764	
H30	1												JQ886765	
H31		1											JQ886766	
H32								1					JQ886767	
H33												1	JQ886768	
H34		1											JQ886769	
H35	1		1	1				1		1		1	JQ886770	
H36			1										JQ886771	
H37												1	JQ886772	
H38	1												JQ886773	
H39							1						JQ886774	
H40										1			JQ886775	
H41	1		1					2	1				JQ886776	
H42											1		JQ886777	
H43										1			JQ886778	
H44										1	1	1	JQ886779	
H45		1											JQ886780	
H46				1							1		JQ886781	
H47												1	JQ886782	
H48					1								JQ886783	
H49		1							1			1	JQ886784	
H50									1				JQ886785	
H51		1		1	1				3	1	2		JQ886786	
H52				1									JQ886787	
H53												1	JQ886788	
H54											1		JQ886789	
H55											1		JQ886790	
H56					1								JQ886791	

表 4 假眼小绿叶蝉不同地理种群 16S rRNA 基因单倍型、核苷酸多样性分析

Table 4 16S rRNA haplotype diversity, nucleotide diversity in different geographic populations of <i>Empoasca vitis</i>					
种群代码 Population code	多态性位点 Polymorphic sites	单倍型 Haplotype	单倍型多样性 Haplotype diversity (Hd)	核苷酸多样性 Nucleotide diversity (π)	核苷酸平均差异数 Average number of nucleotide differences (k)
CQ-YC	8	9	1. 000	0. 005	2. 556
JS-WX	9	8	1. 000	0. 006	3. 071
HN-DZ	7	6	0. 929	0. 005	2. 643
FJ-FZ	8	9	1. 000	0. 006	3. 000
HB-ES	12	7	1. 000	0. 008	4. 381
YN-XSBN	5	4	0. 714	0. 004	2. 000
GD-YD	13	8	1. 000	0. 007	3. 607
HN-CS	10	9	0. 978	0. 006	3. 244
SD-QD	6	7	0. 917	0. 004	1. 944
ZJ-HZ	5	7	1. 000	0. 004	2. 190
GX-GL	15	10	0. 982	0. 007	3. 782
AH-XC	11	8	1. 000	0. 007	3. 500
总群体 Total	56	56	0. 971	0. 006	3. 088

表 5 假眼小绿叶蝉不同地理种群间的 K2P 遗传距离

Table 5 Genetic distance of the different geographic population of <i>Empoasca vitis</i> based on Kimura 2-Parameter model												
采集地 Sampling location	CQ-YC	JS-WX	HN-DZ	FJ-FZ	HB-ES	YN-XSBN	GD-YD	HN-CS	SD-QD	ZJ-HZ	GX-GL	AH-XC
CQ-YC	—											
JS-WX	0. 006	—										
HN-DZ	0. 005	0. 006	—									
FJ-FZ	0. 005	0. 006	0. 005	—								
HB-ES	0. 007	0. 007	0. 007	0. 007	—							
YN-XSBN	0. 004	0. 005	0. 005	0. 004	0. 006	—						
GD-YD	0. 006	0. 007	0. 006	0. 006	0. 008	0. 005	—					
HN-CS	0. 005	0. 006	0. 005	0. 006	0. 007	0. 005	0. 006	—				
SD-QD	0. 005	0. 005	0. 005	0. 005	0. 006	0. 005	0. 006	0. 005	—			
ZJ-HZ	0. 004	0. 005	0. 005	0. 005	0. 007	0. 004	0. 006	0. 005	0. 004	—		
GX-GL	0. 006	0. 006	0. 007	0. 006	0. 008	0. 006	0. 007	0. 007	0. 005	0. 005	—	
AH-XC	0. 006	0. 006	0. 006	0. 006	0. 008	0. 006	0. 007	0. 007	0. 006	0. 005	0. 007	—
<i>E. sudra</i>	0. 240	0. 238	0. 240	0. 240	0. 241	0. 239	0. 241	0. 241	0. 240	0. 240	0. 239	0. 241

表 6 假眼小绿叶蝉 12 个地理种群线粒体 DNA 16S rRNA 基因序列变异的分子变异分析

Table 6 Molecular variance (AMOVA) analysis of mitochondrial DNA 16S rRNA gene sequences in 12 geograhic populations of <i>Empoasca vitis</i>				
变异来源 Source of variation	自由度 d. f.	平方和 Sum of squares	方差组分 Variance components	方差比率 Percentage variation
种群间 Among population	11	20. 242	0. 040Va	2. 6
种群内 Within population	88	132. 598	1. 507Vb	97. 4
总变异 Total	99	152. 840	1. 547	100

固定系数 fixation index, *Fst* 0. 026.

0.714 ~ 1.000 之间;核苷酸多样性指数在 0.004 ~ 0.008 之间。从总体上来看,100 个个体共检测出 56 种单倍型,多态性位点(S)为 56,核苷酸多样性指数(P_i)仅为 0.006,平均核苷酸差异数(k) 3.088。中性检验 Tajima's D 值为 -2.324 ($P < 0.01$),Tajima's D 值接近零时表明群体处于稳定状态, D 值为负数则可能源于近期的群体扩张产生了丰富的稀有等位基因(如群体中检测到的低频率单倍型)。Fu 的 F_s 检验结果为 $F_s = -75.571$ ($P = 0.00$),表明在较近过去假眼小绿叶蝉群体可能经历了一个快速的种群暴发及扩张的事件。

2.3 假眼小绿叶蝉种群间遗传距离

利用 MEGA 4.1 软件,基于 Kimura 2-Parameters 模型计算了两两序列之间核苷酸的遗传距离。得出 12 个种群之间的核苷酸遗传距离在 0.004 ~ 0.008 之间,而与外群桃一点斑叶蝉种群之间的遗传距离在 0.238 ~ 0.241 之间(表 5)。

2.4 假眼小绿叶蝉 mtDNA 16S rRNA 单倍型的进化网络关系

采用简化的中介网络法对 56 种假眼小绿叶蝉 mtDNA 16S rRNA 单倍型网络关系进行构建(图 1)。从图 1 可以看出,整个进化网络呈星状,在群体中具有较高频率的几种单倍型,位于网络进化图的中间,其余低频率的单倍型通过短枝与这几种较高频率的单倍型相连。呈现一种由中心向外辐射,出现频率由高到低的现象。网络关系图的星状放射结构表明,假眼小绿叶蝉在历史上可能经历过种群的扩张,这与中性检验的结果一致。

2.5 假眼小绿叶蝉遗传结构和基因流

通过 AMOVA 分子变异分析结果可以看出(表 6),对假眼小绿叶蝉 12 个地理种群进行遗传结构分析,结果显示种群内和种群间均有遗传变异,但种群内的遗传变异占总变异的 97.4%,明显高于种群间的变异(2.6%)。说明假眼小绿叶蝉的遗传分化主要来自于种群内部。

固定系数通常用来分析不同群体间的分化程度,而基因流则可以揭示群体间基因交流的水平及影响遗传分化的现象。本研究结果显示各种群之间平均的基因流为 1.64(Nei),总体的固定系数 F_{st} 为 0.026,说明各种群之间的基因交流频繁,遗

传分化程度小。

3 讨论

本研究以采集的假眼小绿叶蝉冷冻标本为材料,对其 12 个地理种群的 100 个个体的线粒体 DNA 16S rRNA 基因序列进行了测定、分析,并构建了单倍型的网络进化关系图。在长度为 536 bp 的 100 条 16S rRNA 基因片段序列中,A + T 含量为 76.8%,表明 16S rRNA 基因在碱基组成上具有明显的偏好性,与其它文献报道的昆虫线粒体序列的结果相一致(Jermin and Crozier,1994;Simon *et al.*,1994;苏天凤等,2005;程虹等,2010)。12 个地理种群的单倍型多样性水平(表 2)属于偏高的水平,但是核苷酸多样性较低。这种特征还存在于多种无脊椎动物中(Lavery *et al.*,1996;Bucklin *et al.*,1997)。

从 16S rRNA 分子水平上对不同地理种群假眼小绿叶蝉的遗传关系的进行遗传分析,根据 K2P 法计算各种群之间的遗传距离为 0.004 ~ 0.008,数值都普遍都较低,说明其遗传分化程度很低,且各种群与外群之间的遗传距离基本一致。但是,利用 RAPD 标记基于核基因组 DNA 对假眼小绿叶蝉不同地理种群的遗传多样性研究发现多具有比较丰富的遗传多样性,种群间的遗传距离在 0.119 ~ 0.347 之间(付建玉和韩宝瑜,2007)。因此,我们推测假眼小绿叶蝉近期才在茶园中扩散,由于扩散的历史较短,在线粒体基因组上积累的变异还少,表现出的遗传差异较小。多重序列比对和单倍型网络进化图结果亦得出相同结论,即全国不同地理的假眼小绿叶蝉种群不存在明显的遗传分化变异。理论上,种内适应于不同生态条件的遗传类群在种群遗传分化上应存在一定的差异,因为各自所处的生态环境条件会对其种群的遗传结构产生影响。如长期在地理位置、海拔差距较大的地域中会逐渐形成基因中的差异性,从而造成同一种群中不同个体分布于不同的生态环境中所形成的种群内丰富的遗传多态性。就本研究而言,12 个种群分布广,在地理位置、海拔和气候等都存在较大的差异,但其遗传分化程度较低,这充分说明了小绿叶蝉线粒体 16S rRNA 的保守性(刘殿锋等,2005)。

固定系数 F_{st} (或称基因分化系数)作为遗传距离的一种常用测度参数,可反映出不同物种或

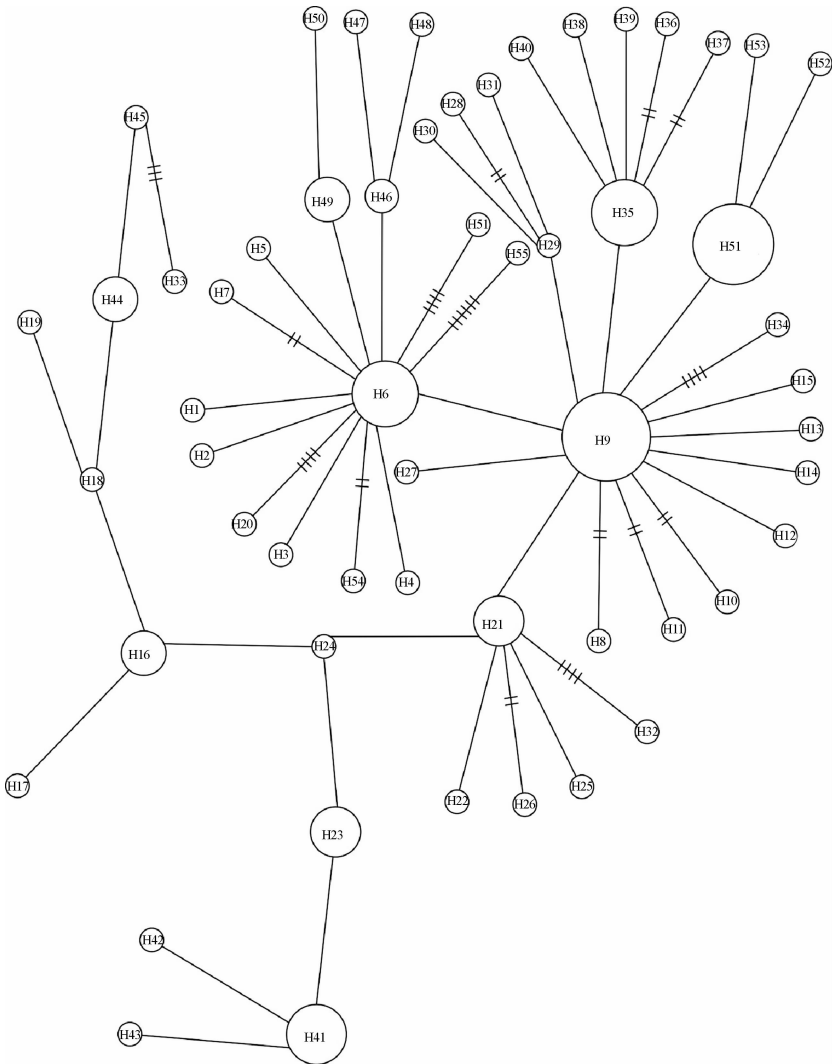


图 1 56 种 mtDNA 16S rRNA 单倍型的进化网络关系

Fig.1 Median-joining network of 56 mtDNA 16S rRNA haplotypes

注:短线代表单倍型间的碱基替换数目,H1 ~ H56 表示单倍型,圈的大小表示单倍型在样品中出现的频率。

Short perpendiculars on lines show number of nucleotide substitutions between haplotypes.

Area of circle is proportional to haplotype frequency. H1 - H56 indicates haplotypes.

种群之间的基因差异程度,假眼小绿叶蝉不同地理种群之间的 F_{st} 值在 $-0.071 \sim 0.188$ 之间,总群体的 F_{st} 值为 0.029 。据报道,基因分化系数的值介于 $0 \sim 0.05$ 之间表示群体间遗传分化程度很弱, $0.05 \sim 0.15$ 为分化程度中等, $0.15 \sim 0.25$ 为分化程度较大,大于 0.25 为分化程度很大 (Rousset, 1997)。因此从总体上看,假眼小绿叶蝉不同地理种群之间的遗传分化程度很弱。

基因流 (N_m) 指一个种群的基因转移至另外一个种群,它通常是个体迁移的结果。通常认为当 N_m 值大于 1 时,说明群体之间没有明显的遗传

分化或遗传分化程度很低,当 N_m 值小于 1 时,表示存在着遗传漂变而发生了分化,通常 N_m 值大于 4 表明种群之间的基因交流比较充分 (Allendorf, 1983)。本研究中假眼小绿叶蝉种群总的基因流 N_m 为 1.64 (Nei),说明各种群之间基因交流程度较高 (Nei, 1982; 吕宝忠等, 2002)。分子变异分析 (AMOVA) 结果表明来自种群内的遗传变异占总变异的 97.4% ,明显高于种群间的变异 (2.6%),此结果也反映出种群间的基因交流频繁。

本试验结果显示,分布于我国 12 个不同区域

的假眼小绿叶蝉在遗传上有着较大的保守性,这可能由以下几个因素造成的:第一,16S rRNA 基因相对比较保守,进化速率比较慢;第二,假眼小绿叶蝉虽飞行能力较弱,不作远距离迁飞,但不排除其能随气流扩散的可能,因此,如果这些扩散在适宜的条件下不间断发生,经过一定时间后,很有可能使得与相邻地理种群之间发生基因交流频繁;第三,茶园生态环境相对稳定,而种群的分化程度依赖于其所在的生态条件相适应的结果,如果生态条件所产生的选择作用大体相同,则各分布区内的种群难以在短期内形成显著的遗传分化。

本研究结果表明,假眼小绿叶蝉的线粒体 16S rRNA 相对保守,在不同地理种群之间变异分化程度很小,不适用于其种下阶元研究。因此要深入了解茶园假眼小绿叶蝉种群间的遗传分化及是否存在种下分化现象,还需进一步发掘和选择合适的遗传标记。今后还需引入小绿叶蝉属中的其他近缘种,以系统研究假眼小绿叶蝉的进化史及其在茶园适应与演替过程。

致谢:感谢科技基础性工作专项“茶树病虫和天敌资源调查、鉴定、保存与编目”(2008FY210500)课题有关参加单位和个人为本研究提供的虫源。

参考文献 (References)

- Allendorf FW, 1983. Gene flow and genetic differentiation among populations. *Conserv. Genet.*, 18(3):51–65.
- Bucklin A, Smolenack SB, Bentley AM, Viebe PH, 1997. Gene flow patterns of the euphausiid *Meganyctihanes norvegica* in the NW Atlantic based on mtDNA sequences for cytochrome b and cytochrome oxidase I. *Plankton Res.*, 11:1763–1781.
- Excoffier LG, Laval S, Schneider S, 2005. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform.*, 1:47–50.
- Fu Y, 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147:915–925.
- Hu C, 1997. Distribution and importance of arthropod pests of tea in southern China // Yang LL, Wang R (eds.). *The Distribution and Importance of Arthropod Pests and Weeds of Agriculture and Forestry Plantation in Southern*. Waterhouse, DF. Aciar, Australia. 100–101.
- Jermiin LS, Crozier RH, 1994. The cytochrome b region in the mitochondrial DNA of the ant *Tetraponeru rufoniger*: sequence divergence in Hymenoptera may be associated with nucleotide content. *Mol. Biol. Evol.*, 38:282–294.
- Lavery S, Moritz C, Fielder DR, 1996. Indo-Pacific population structure and evolutionary history of the coconut crab *Birgus latro*. *Mol. Ecol.*, 5:557–570.
- Librado P, Rozas J, 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25:1451–1452.
- Lunt DH, Ibrahim KM, Hewitt GM, 1998. mtDNA phylogeography and postglacial patterns of subdivision in the meadow grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Heredity*, 80:633–641.
- Machado EG, Dennebouy N, Suarez MO, Mounolou JC, Monnerot M, 1993. Mitochondrial 16S-rRNA gene of two species of shrimps: sequence variability and secondary structure. *Crustaceana*, 65:279–286.
- Nei M, 1982. Evolution of human races at the level. *Prog. Clin. Biol. Res.*, Pt A: 167–183.
- Polzin T, Daneschm SV, 2003. On steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Oper. Res. Lett.*, 31:12–20.
- Rousset F, 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*, 145:1219–1228.
- Shufran KA, Burd JD, Anstead JA, Lushai G, 2000. Mitochondrial DNA sequence divergence among greenbug (Homoptera: Aphididae) biotypes: evidence for host-adapted races. *Insect Mol. Biol.*, 9(2):279–284.
- Simon C, Frqti F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P, 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 87(5):651–701.
- Smith PT, 2005. Mitochondrial DNA variation among populations of the glassy-winged sharpshooter, *Homalodisca coagulata*. *Insect Sci.*, 2005.5:41.
- Tajima F, 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123:585–595.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, 2007. MEGA 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24:1596–1599.
- Zanol J, Halanych KM, Struck TH, 2010. Phylogeny of the bristle worm family Eunicidae (Eunicida, Annelida) and the phylogenetic utility of noncongruent 16S, COI and 18S in