

中国松毛虫属八个种和亚种亲缘关系的 DNA 指纹证据

张爱兵¹; 孔祥波², 李典谟^{1*}, 刘友樵¹

(1. 中国科学院动物研究所, 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100080;

2. 中国林业科学院森林生态环境与保护研究所, 北京 100091)

摘要: 利用 DNA 指纹谱方法探讨了中国松毛虫属 8 个种和亚种(马尾松毛虫 *Dendrolimus punctatus punctatus* (Walker), 德昌松毛虫 *D. punctatus tehchangensis* Tsai et Liu, 文山松毛虫 *D. punctatus wenshanensis* Tsai et Liu, 思茅松毛虫 *D. kikuchii* Matsumura, 赤松毛虫 *D. spectabilis* Butler, 油松毛虫 *D. tabulaeformis* Tsai et Liu, 落叶松毛虫 *D. superans* (Butler), 云南松毛虫 *D. houi* Lajonquiere) 之间的亲缘关系。13 个随机引物在 8 种松毛虫中共检测到 168 个多态分子标记。分析表明, 这 8 个种间的遗传距离的变化范围为 0.3780~0.7360; 马尾松毛虫与其亚种德昌松毛虫的遗传距离最近, 为 0.3780, 与其另一亚种文山松毛虫以及油松毛虫的遗传距离次之, 皆为 0.5233; 赤松毛虫、落叶松毛虫、云南松毛虫与马尾松毛虫的遗传距离则再次之, 分别为 0.6362, 0.6770 和 0.6944; 与马尾松毛虫遗传距离最远的是思茅松毛虫, 为 0.7360。8 种松毛虫间具体的亲缘关系为: (*D. superans* (*D. tabulaeformis* (*D. p. wenshanensis* (*D. p. tehchangensis*, *D. p. punctatus*)))) (*D. kikuchii* (*D. spectabilis*, *D. houi*))。

关键词: 松毛虫; 松毛虫属; 亲缘关系; DNA 指纹

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2004)02-0236-07

DNA fingerprinting evidence for the phylogenetic relationship of eight species and subspecies of *Dendrolimus* (Lepidoptera: Lasiocampidae) in China

ZHANG Ai-Bing¹, KONG Xiang-Bo², LI Dian-Mo^{1*}, LIU You-Qiao¹ (1. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China; 2. Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China).

Abstract: Eight species and subspecies of *Dendrolimus*, *D. punctatus punctatus* (Walker), *D. punctatus tehchangensis* Tsai et Liu, *D. punctatus wenshanensis* Tsai et Liu, *D. kikuchii* Matsumura, *D. spectabilis* Butler, *D. tabulaeformis* Tsai et Liu, *D. superans* (Butler), and *D. houi* Lajonquiere have been the most serious and economically damaging insect pests in Chinese pine forests in recent years. Twenty 10-oligonucleotide primers were initially screened. We used 13 primers, which produced 168 polymorphic molecular markers to analyze the phylogenetic relationship of the eight taxa of *Dendrolimus* in China. The pair-wise Nei's genetic distances (Nei's *D*) were estimated for the eight taxa of *Dendrolimus*. The pairwise Nei's *D* varied in the range of 0.3780–0.7360. *D. p. tehchangensis* Tsai et Liu, and *D. p. wenshanensis* Tsai et Liu, which are two subspecies of *D. punctatus* traditionally, have nearer genetic distances with *D. p. punctatus*. The detailed phylogenetic relationship among the eight species and subspecies of *Dendrolimus* based on UPGMA should be as the following: (*D. superans* (*D. tabulaeformis* (*D. wenshanensis* (*D. tehchangensis*, *D. punctatus*)))) (*D. kikuchii* (*D. spectabilis*, *D. houi*)).

Key words: Pine caterpillars; *Dendrolimus*; phylogenetic relationship; DNA fingerprinting

松毛虫属 *Dendrolimus* (鳞翅目: 枯叶蛾科) 昆虫全世界共有 30 余种, 其中在中国有 27 种分布, 是针叶树种, 包括松属 *Pinus*、落叶松属 *Larix*、云杉

Picea、冷杉 *Abies* 等的重要害虫, 广泛分布于全国 28 个省、市、自治区, 其中严重危害松林具有典型代表性的有马尾松毛虫 *Dendrolimus punctatus* (Walker)、

基金项目: 国家自然科学基金重大项目(39893360); 国家重点基础研究发展规划项目(G2000016210); 中国科学院创新方向项目(KSCX2-1-02, KSCX2-SW-103)

作者简介: 张爱兵, 男, 1971 年 2 月生, 博士, 主要从事系统生态、分子生态学研究

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: lidm@panda.ioz.ac.cn

收稿日期 Received: 2003-03-25; 接受日期 Accepted: 2004-01-8

油松毛虫 *D. tabulaeformis* Tsai et Liu、赤松毛虫 *D. spectabilis* Butler、云南松毛虫 *D. houi* Lajonquiere、落叶松毛虫 *D. superans* (Butler)和思茅松毛虫 *D. kikuchii* Matsumura,这6种松毛虫经常大面积暴发,影响林木生长,严重时树木大片枯死,在大发生时常有松毛虫毒毛致病(松毛虫病、关节肿大)、致残(致盲)的报道(侯陶谦,1987;陈昌洁,1990;萧刚柔,1992;王寅威和姜素贞,1999)。这6种松毛虫在全国的分布亦有典型的代表性,如马尾松毛虫(包括含德昌松毛虫 *D. punctatus tehchangensis* Tsai et Liu和文山松毛虫 *D. punctatus wenshanensis* Tsai et Liu两个亚种)、思茅松毛虫和云南松毛虫主要分布于中国的南部,落叶松毛虫、油松毛虫和赤松毛虫主要分布于我国的东北和华北地区,这几种松毛虫的分布区还互有重叠,表现为同一地区不同松毛虫的混同发生(赵清山等,1992)。

由于松毛虫是我国最重要的森林害虫,其生物学特性、防治和管理等方面都有较为深入的研究(李天生,1986;侯陶谦,1987;陈昌洁,1990;萧刚柔,1991;Zhang et al., 2003)。如对松毛虫性信息素的研究,阐明了马尾松毛虫性信息素的主要成分是 Z5, E7-12: OH, Z5, E7-12: OAc 和 Z5, E7-12: OPr; 赤松毛虫性信息素成分是 Z5, E7-12: OH; 油松毛虫性信息素包含 Z5, E7-12: OH 和 Z5, E7-12: OAc 及 Z5, E7-12: OPr 3种成分(Ando et al., 1982;孟宪佐和王怀敏,1983)。然而关于松毛虫属某些种类的亲缘关系或分类地位的确定历史上争议颇多。例如,是否可将油松毛虫和赤松毛虫定为马尾松毛虫的两个亚种。围绕相关问题,历史上曾有3例经典的杂交遗传实验,蔡邦华等(1965)进行了马尾松毛虫、油松毛虫和赤松毛虫3种松毛虫之间的杂交遗传实验,结果表明3种松毛虫皆可相互杂交,但交配率不同,以马尾松毛虫×赤松毛虫的交配率最低,认为是亲缘关系较远的缘故,而赤松毛虫和油松毛虫比较容易进行种间杂交;赵清山等进行了马尾松毛虫和油松毛虫之间的杂交遗传实验(赵清山等,1992),结果表明,不论从食性、形态特征、混合配对和单个配对试验的结果看,两者应为同一物种,考虑到其形态及生态学上的一些差异,认为油松毛虫应为马尾松毛虫的一个亚种,并将其命名为 *Dendrolimus punctatus tabulaeformis* (Tsai et Liu);赵清山等(1999)又进行了马尾松毛虫、油松毛虫、赤松毛虫和落叶松毛虫4种松毛虫之间的杂交遗传实验,这四种松毛虫相互之间能够进行杂交,其中油松毛

虫和赤松毛虫分别与马尾松毛虫进行杂交,无论正交或反交都可以进行,并产生具生育力的 F_1 代,证明它们之间不存在生殖隔离;但这3种松毛虫与落叶松毛虫的 F_1 代杂种,幼虫死亡率极高,因而认为油松毛虫、赤松毛虫和马尾松毛虫应为同一物种。根据松毛虫属性信息素成分的研究,欧洲松毛虫和落叶松毛虫属于含有 Z5, E7-12: Ald 而不含任何酯类成分的第一种性信息素类型(孔祥波等,2001);赤松毛虫,油松毛虫、思茅松毛虫和马尾松毛虫属于含有 Z5, E7-12: OAc 及相应的醇或丙酸酯,但不含任何醛类成分的第二种性信息素类型(Ando et al., 1982;孔祥波等,2001),这4种松毛虫具体的性信息素成分或比例有差异。综上所述,无论是形态学、遗传学还是化学生态学,都给出了各自的证据来阐明中国主要松毛虫中的两种或几种松毛虫间的亲缘关系,尽管如此,到目前仍然没有形成一致的看法。

在国外 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 指纹技术已广泛应用于昆虫种类鉴别和亲缘关系、分类地位的研究中。如 Black 等(1992)对4种蚜虫的鉴别比较, Gamer 和 Slavicek (1996)对亚洲和美洲舞毒蛾的区分。关于 RAPD 指纹技术的特点及其在昆虫分类中的应用可参见 Hadrys 等(1992)和鲁亮等(1995)的综述。

到目前为止,鉴于对多种松毛虫之间进行杂交遗传实验的难度(如发生期不统一等),尚未见对松毛虫属中8种(含马尾松毛虫3亚种)主要松毛虫亲缘关系研究的系统报道。我们用 RAPD DNA 指纹谱的方法首次对松毛虫属8种主要松毛虫的亲缘关系进行了初步探讨,为阐明松毛虫属中8种主要松毛虫的亲缘关系提供了分子生物学证据,也为生产实践上多种松毛虫的综合防治提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

马尾松毛虫 *D. punctatus punctatus* (Walker), 德昌松毛虫 *D. punctatus tehchangensis* Tsai et Liu, 文山松毛虫 *D. punctatus wenshanensis* Tsai et Liu, 思茅松毛虫 *D. kikuchii* Matsumura, 赤松毛虫 *D. spectabilis* Butler, 油松毛虫 *D. tabulaeformis* Tsai et Liu, 落叶松毛虫 *D. superans* (Butler), 云南松毛虫 *D. houi* Lajonquiere 采样点见表1, 室内羽化为成虫后, 99% 酒精浸泡, -20℃ 保存备用, 并进行种类鉴定。

表 1 松毛虫属 8 种松毛虫的采样点及地理坐标
Table 1 Sampling sites of the eight taxa of *Dendrolimus* in China

| 采样点 Sampling sites | | 地理坐标 Geographical coordinate | | 物种 Species |
|-----------------------|-------------|---------------------------------|--------------|---|
| 省 Province | 县(市)County | 纬度 Latitude | 经度 Longitude | |
| 安徽 Anhui | 潜山 Qianshan | 30.6°N | 116.5°E | 马尾松毛虫 <i>D. punctatus punctatus</i> Walker |
| 云南 Yunnan | 永仁 Yongren | 26.0°N | 101.7°E | 德昌松毛虫 <i>D. punctatus tehchangensis</i> Tsai et Liu |
| 云南 Yunnan | 文山 Wenshan | 23.3°N | 104.2°E | 文山松毛虫 <i>D. punctatus wenshanensis</i> Tsai et Liu |
| 安徽 Anhui | 东至 Dongzhi | 30.0°N | 117.0°E | 思茅松毛虫 <i>D. kikuchii</i> Matsumura |
| 辽宁 Liaoning | 阜新 Fuxin | 42.0°N | 121.6°E | 赤松毛虫 <i>D. spectabilis</i> Butler |
| 北京 Beijing | 怀柔 Huairou | 40.3°N | 116.6°E | 油松毛虫 <i>D. tabulaeformis</i> Tsai et Liu |
| 辽宁 Liaoning | 西丰 Xifeng | 42.7°N | 124.7°E | 落叶松毛虫 <i>D. superans</i> (Butler) |
| 云南 Yunnan | 景洪 Jinghong | 22.0°N | 100.8°E | 云南松毛虫 <i>D. houi</i> Lajonquiere |

1.2 基因组 DNA 的提取和纯化

PK 提取液的配制: ① TE (pH 8.0) 90 μ L ② Solution B 50 μ L ③ 10% SDS 7.5 μ L ④ Proteinase K (10 mg/mL) 7 μ L, 60°C 水浴中 > 2 h, 中间轻轻混合 1 次。加入 100 μ L 饱和酚 (pH 8.0, 苯酚), 混合至形成乳浊液; 冰中放置约 2 min, 中间混合 1 次; 4°C, 10 000 r/min 离心 5 min; 将上层水相转移到一干净的 1.5 mL 离心管中, 并加入 100 μ L 饱和酚; 混合并重复上述步骤直至水相和有机相界面上无白色沉淀物; 上清液转移到一干净离心管中, 加入 1 vol 10 mol/L NH₄Ac 溶液, 混合均匀, 点转离心约 2 s, 加入 2.5 vol 超纯无水酒精, 混合均匀。检查是否有絮状沉淀出现。12 000 r/min 离心 15 min, 观察有无沉淀, 弃上清, 沥干。70% 酒精中冲洗 (去除盐离子), 点转离心, 弃上清, 100% 酒精脱水, 点转离心, 弃上清, 沥干, 风干, 约 20 min。沉淀溶于 100 μ L TE 中, 置于 -20°C 冰箱中长期保存。

1.3 引物的筛选和 PCR 扩增条件的优化

从 Operon 公司生产的 C 系列引物中筛选出 13 种重复性好, 多态性高的引物 (见表 2), 进行松毛虫属 8 个种的 DNA 指纹分析。经优化, 扩增反应条件为, 反应总体积 15 μ L, 包括 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl, 0.1% Triton X-100, 2 mmol/L MgCl₂, Taq 酶 (Promega) 用量为 1.25U/15 μ L, dNTP 100 μ mol/L, 模板基因组 DNA 10 ng 左右。混匀后加一滴矿物油, 在 GeneAmp PCR System 9700 中预变性 94°C 2 min, 随后进行 40 轮循环。每轮循环由 94°C, 50 s; 37°C, 50 s; 72°C, 1 min 50 s 组成, 最后一个循环结束在 72°C 延伸 7 min。扩增产物用含有 0.05% 溴化乙锭的 1.4% 琼脂糖凝胶电泳检测, 以 100 bp ladder 作为

分子量标准。电泳电压为 100 V, 2.5 h, 紫外灯下拍照 (图 1A, B, C)。

表 2 所用随机引物及其序列

Table 2 Primers and its sequences used in this study

| 引物 Primer | 序列 Sequence | 引物 Primer | 序列 Sequence |
|--------------|------------------|--------------|------------------|
| OPG03 | 5'-GAGCCCTCCA-3' | OPG13 | 5'-CTCTCCGCCA-3' |
| OPG04 | 5'-AGCGTGCTG-3' | OPG14 | 5'-GGATGAGACC-3' |
| OPG05 | 5'-CTGAGACGGA-3' | OPG15 | 5'-ACTGGGACTC-3' |
| OPG06 | 5'-GTGCTAACC-3' | OPG16 | 5'-ACCGCTCCTC-3' |
| OPG09 | 5'-CTGACGTCAC-3' | OPG17 | 5'-ACGACCGACA-3' |
| OPG10 | 5'-AGGGCCGCTC-3' | OPG19 | 5'-CTCAGGGCAA-3' |
| OPG11 | 5'-TCCCCGTCGT-3' | | |

1.4 数据统计分析方法

记录电泳图谱中那些谱带清晰, 并能在重复实验中稳定出现的条带。根据分子量标记的迁移率及带的有无, 分别记为 1 和 0。应用 RAPDDISTANCE (Black, 1995) 软件包计算种间遗传距离, 利用 PHYLIP3.6 软件包 (<http://bioinformatics.weizmann.ac.il/pub/software/evolve/phyliip3.6/>), 采用 UPGMA 方法进行聚类分析。

2 结果

13 个随机引物在 8 种松毛虫中共检测到 168 个多态分子标记 (表 4), 检测到 19 个种特异的分子标记: 马尾松毛虫 2 个 (G09, G11), 文山松毛虫 2 个 (G09, G11), 思茅松毛虫 1 个 (G11), 赤松毛虫 6 个 (G09, G10, G11), 油松毛虫 3 个 (G09, G11), 云南松毛虫 1 个 (G10), 落叶松毛虫 4 个 (G09, G11)。

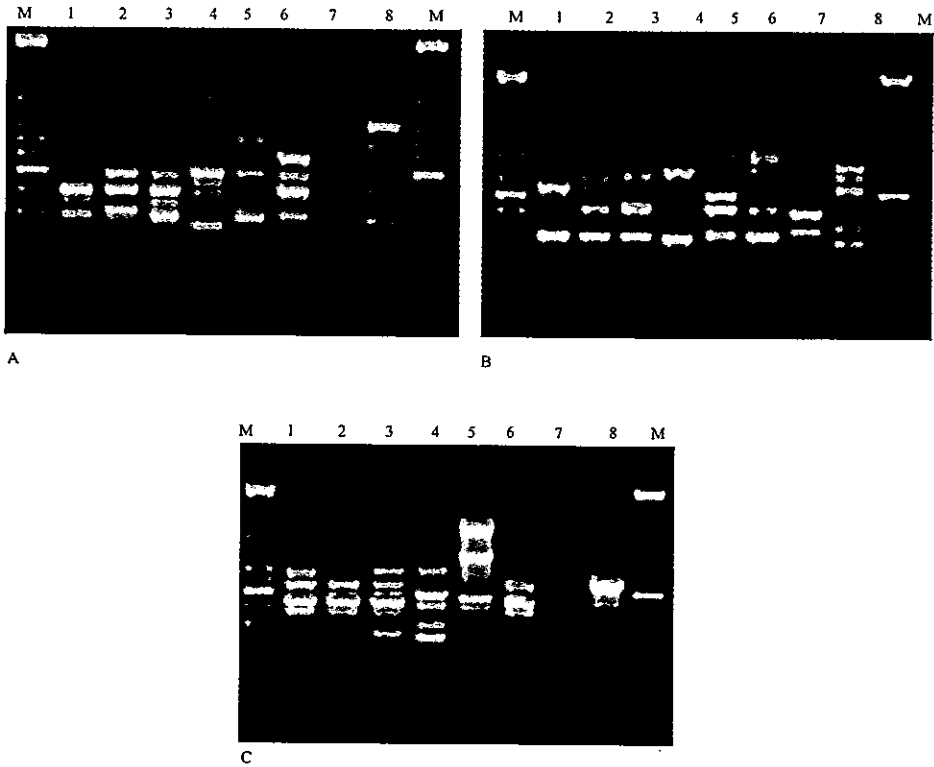


图 1 8 种松毛虫 DNA 的随机扩增结果

Fig. 1 RAPD results of the eight taxa of *Dendrolimus*

A. 引物 G16 Primer G16; B. 引物 G05 Primer G05; C. 引物 G19 Primer G19.

1: 马尾松毛虫 *D. p. punctatus*; 2: 德昌松毛虫 *D. p. tehchangensis*; 3: 文山松毛虫 *D. p. wenshanensis*; 4: 思茅松毛虫 *D. kikuchii*; 5: 赤松毛虫 *D. spectabilis*; 6: 油松毛虫 *D. tabulaeformis*; 7: 云南松毛虫 *D. houi*; 8: 落叶松毛虫 *D. superans*; M: 为 100 bp ladder.

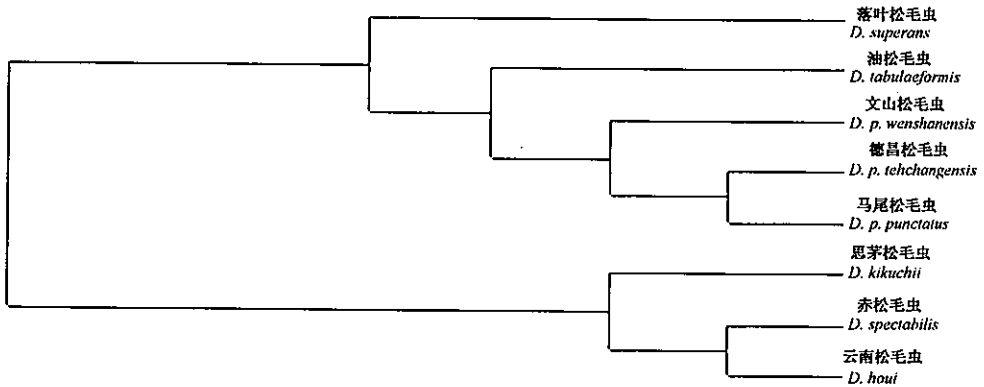


图 2 松毛虫属 8 种松毛虫 UPGMA 聚类图

Fig. 2 Phylogenetic relationship of the eight taxa of *Dendrolimus* based on UPGMA in China

表 3 8 种松毛虫种间赖氏遗传距离

Table 3 Pairwise Nei's *D* between the eight taxa of *Dendrolimus* in China

| | 文山松毛虫 <i>D. p.</i> <i>wenshanensis</i> | 德昌松毛虫 <i>D. p.</i> <i>tehchangensis</i> | 马尾松毛虫 <i>D. p.</i> <i>punctatus</i> | 思茅松毛虫 <i>D.</i> <i>kikuchii</i> | 赤松毛虫 <i>D.</i> <i>spectabilis</i> | 油松毛虫 <i>D.</i> <i>tabulaeformis</i> | 云南松毛虫 <i>D. houii</i> | 落叶松毛虫 <i>D. superans</i> |
|----------------------------------|--|---|---|---------------------------------------|---|---|--------------------------|-----------------------------|
| 文山松毛虫 <i>D. p. wenshanensis</i> | 0.0000 | | | | | | | |
| 德昌松毛虫 <i>D. p. tehchangensis</i> | 0.4756 | 0.0000 | | | | | | |
| 马尾松毛虫 <i>D. p. punctatus</i> | 0.5233 | 0.3780 | 0.0000 | | | | | |
| 思茅松毛虫 <i>D. kikuchii</i> | 0.6682 | 0.6944 | 0.7360 | 0.0000 | | | | |
| 赤松毛虫 <i>D. spectabilis</i> | 0.6362 | 0.6172 | 0.6362 | 0.6592 | 0.0000 | | | |
| 油松毛虫 <i>D. tabulaeformis</i> | 0.5345 | 0.5000 | 0.5233 | 0.6857 | 0.6547 | 0.0000 | | |
| 云南松毛虫 <i>D. houii</i> | 0.6220 | 0.6501 | 0.6944 | 0.5876 | 0.5825 | 0.6682 | 0.0000 | |
| 落叶松毛虫 <i>D. superans</i> | 0.6501 | 0.6026 | 0.6770 | 0.6726 | 0.6770 | 0.6501 | 0.6172 | 0.0000 |

表 4 13 个随机引物在 8 种松毛虫中扩增出的多态性条带数目

Table 4 Number of polymorphic molecular markers produced with 13 primers in the eight taxa of *Dendrolimus*

| 引物 Primer | 马尾松毛虫 <i>D. p.</i> <i>punctatus</i> | 德昌松毛虫 <i>D. p.</i> <i>tehchangensis</i> | 文山松毛虫 <i>D. p.</i> <i>wenshanensis</i> | 思茅松毛虫 <i>D. kikuchii</i> | 赤松毛虫 <i>D.</i> <i>spectabilis</i> | 油松毛虫 <i>D.</i> <i>tabulaeformis</i> | 云南松毛虫 <i>D. houii</i> | 落叶松毛虫 <i>D.</i> <i>superans</i> | 条带总数 Total |
|--------------|---|---|--|-----------------------------|---|---|--------------------------|---------------------------------------|---------------|
| OPG03 | 7 | 7 | 6 | 3 | 5 | 1 | 3 | 5 | 11 |
| OPG04 | 2 | 5 | 2 | 3 | 6 | 3 | 3 | 3 | 13 |
| OPG05 | 2 | 3 | 3 | 6 | 4 | 7 | 2 | 5 | 11 |
| OPG06 | 4 | 5 | 7 | 2 | 3 | 5 | 2 | 3 | 9 |
| OPG09 | 9 | 9 | 5 | 5 | 7 | 2 | 9 | 9 | 17 |
| OPG10 | 8 | 8 | 2 | 4 | 5 | 2 | 5 | 4 | 12 |
| OPG11 | 8 | 8 | 6 | 5 | 7 | 5 | 6 | 6 | 17 |
| OPG13 | 6 | 9 | 5 | 8 | 3 | 2 | 8 | 5 | 14 |
| OPG14 | 5 | 5 | 4 | 3 | 5 | 2 | 3 | 5 | 9 |
| OPG15 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 1 | 5 | 4 | 10 |
| OPG16 | 4 | 4 | 6 | 3 | 4 | 5 | 3 | 5 | 10 |
| OPG17 | 7 | 7 | 4 | 5 | 7 | 0 | 9 | 8 | 17 |
| OPG19 | 4 | 4 | 6 | 6 | 4 | 3 | 0 | 3 | 18 |

8 个种间的遗传距离变化范围为 0.3780 ~ 0.7360 (表 3), 以马尾松毛虫为例, 马尾松毛虫与其亚种德昌松毛虫的遗传距离最近, 为 0.3780 (表 3), 与其另一亚种文山松毛虫以及油松毛虫的遗传距离次之, 皆为 0.5233; 赤松毛虫与马尾松毛虫的遗传距离则再次之, 为 0.6362, 与马尾松毛虫遗传距离最远的是思茅松毛虫, 为 0.7360, 则由此推断这 7 种松毛虫与马尾松毛虫亲缘关系由近到远依次为: 德昌松毛虫 < 文山松毛虫 = 油松毛虫 < 赤松毛虫 < 落叶松毛虫 < 云南松毛虫 < 思茅松毛虫 (图 2, 表 3)。

UPGMA 聚类分析结果 (图 2) 表明, 马尾松毛

虫、德昌松毛虫、文山松毛虫、油松毛虫以及落叶松毛虫聚为一类; 赤松毛虫、云南松毛虫、思茅松毛虫聚为一类。

3 讨论

不同种松毛虫的混合发生, 以及天然杂交种杂种优势 (抗逆性强, 生存率高) (赵清山等, 1999) 的存在, 是松毛虫灾害较为严重和难以彻底根除的重要原因之一。探明松毛虫种间亲缘关系的远近, 对于多种松毛虫的联防联治, 以及阐明它们的分类地位

具有重要意义,在前人形态分类和杂交遗传实验研究的基础上,我们采用 DNA 指纹谱的方法对中国发生最为严重的 8 种松毛虫的分类地位和亲缘关系进行了初步的探讨,从另一个侧面对前人的研究结论进行了佐证和补充。

本文结果显示,德昌松毛虫、文山松毛虫、油松毛虫应与马尾松毛虫的亲缘关系较近,但德昌松毛虫与马尾松毛虫的亲缘关系最近,其次为文山松毛虫和油松毛虫。油松毛虫性诱剂与马尾松毛虫性信息素中都包含 Z5, E7-12: OH、Z5, E7-12: OAc 和 Z5, E7-12: OPr 3 种成分(孟宪佐和王怀敏, 1983)以及这两种松毛虫之间的杂交遗传实验能够顺利进行,并且杂种后代可育(赵清山等, 1992),这都说明了油松毛虫与马尾松毛虫的亲缘关系较近。此外,形态学研究表明,马尾松毛虫、油松毛虫和赤松毛虫在形态上十分近似,而马尾松毛虫和油松毛虫更近似。落叶松毛虫与马尾松毛虫的亲缘关系较远,表现为杂交配对受阻、幼虫死亡率高或滞育,部分组合能产生 F₁ 代,但 F₁ 代自交不能产生 F₂ 代(赵清山等, 1999)。赤松毛虫虽含有 Z5, E7-12: OH 和 Z5, E7-12: OAc 及 Z5, E7-12: OPr 3 种性信息素成分(Ando *et al.*, 1982; 孔祥波等, 2003),但与马尾松毛虫比较,3 种成分的比例存在很大差异。另外,马尾松毛虫、油松毛虫和赤松毛虫的交配率不同,以马尾松毛虫和赤松毛虫的交配率最低(11% ~ 31%)(蔡邦华等, 1965),在本研究中赤松毛虫与马尾松毛虫的遗传距离远于油松毛虫与马尾松毛虫的遗传距离(图 4, 表 3),在 UPGMA 聚类中与云南松毛虫、思茅松毛虫聚为一类,这似乎有悖常理,因为从地域分布上来看,赤松毛虫分布于我国北方,云南松毛虫和思茅松毛虫则分布于我国南方,前者与后两者为异域分布,且两种松毛虫个体间差异较大,但思茅松毛虫性信息素成分与赤松毛虫性信息素成分完全一致,属于同一性信息素类型(孔祥波等, 2001),因而我们从 DNA 指纹与从性信息素成分得出的结论是一致的。

综合形态学证据,遗传学证据,化学生态学(性信息素化学)证据,本研究的 DNA 指纹证据以及它们的地理分布,我们对文中所涉及的 8 种松毛虫的系统演化(或亲缘关系)做一个初步的推断或假说:马尾松毛虫在我国西南的云贵高原由于复杂的地理环境形成的地理隔离,而导致德昌松毛虫和文山松毛虫两个亚种的形成,这是最近的两次物种演化事件,在时间上德昌松毛虫最近,文山松毛虫稍

早;而在此之前,油松毛虫与马尾松毛虫分离,向北扩展;在其扩展的北端——辽东半岛和山东半岛,又形成一个新的分支——赤松毛虫;而其他三种松毛虫则是更早与马尾松毛虫分离,最早为思茅松毛虫,其次为云南松毛虫,最后是落叶松毛虫。

然而,对于理解松毛虫属内的系统演化关系,应该对更多的物种进行进一步的研究;而且,由于 RAPD 指纹谱方法的局限,无法估计物种的分离时间,在进一步的研究中,可以选用其他的分子标记以便根据分子钟速率估计各物种之间相互分离的具体时间。

致谢 感谢中国科学院动物研究所张德兴研究员在 DNA 提取过程中所给予的技术上的指导,感谢匿名评审专家对文章所提出的宝贵的修改意见。

参考文献 (References)

- Ando T, Vu MH, Yohida S, Takahashi N, Tatsuki S, Katagiri K, Yamane A, Ikeda T, Yamazaki S, 1982. (5Z, 7E)-5, 7-Dodecadien-1-ol: female sex pheromone of the pine moth *Dendrolimus spectabilis* Butler. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46(3): 709 - 715.
- Black WC IV, 1995. FORTRAN Programs for the Analysis of RAPD-PCR Markers in Populations. Colorado State University. Ft. Collins. CO.
- Black WC IV, DuTeau NM, Puterka GJ, Nechols JR, Pettorini JM, 1992. Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera: Aphididae). *Bull. Entomol. Res.*, 82: 151 - 159.
- Chai BH, Hou TQ, Song SM, 1965. Crossbreeding of pine moths and primary investigation on the biological features of crossbreeds. *Acta Entomol. Sin.*, 14(4): 347 - 359. [蔡邦华, 侯陶谦, 宋士美, 1965. 松毛虫的种间杂交及杂种生物学的初步观察. 昆虫学报, 14(4): 347 - 359]
- Chen CJ, 1990. Integrated Management of Pine Caterpillars in China. Beijing: China Forestry Publishing House. 5 - 25. [陈昌浩, 1990. 松毛虫综合管理. 北京: 中国林业出版社. 5 - 25]
- Chen TM, 1980. The 15th International Congress of Entomology Held at Kyoto, Japan, August.
- Garner KJ, Slavicek JM, 1996. Identification and characterization of a RAPD-PCR marker for distinguishing Asian and North American gypsy moths. *Insect Molecular Biology*, 5 (2): 81 - 91.
- Hadrys H, Balick M, Schierwater B, 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology.

Molecular Ecology, 1: 55 - 63.

- Hou TQ, 1987. Pine Caterpillars in China. Beijing: Science Press. 6 - 31. [侯陶谦, 1987. 中国松毛虫. 科学出版社. 6 - 31]
- Kong XB, Zhao CH, Gao W, 2001. Identification of sex pheromones of four economically important species in genus *Dendrolimus*. *Chinese Science Bulletin*, 46(24): 2 077 - 2 082. [孔祥波, 赵成华, 高伟, 2001. 4 种松毛虫性信息素成分及在近缘种生殖隔离中的作用. 科学通报, 46(17): 1 435 - 1 439]
- Li TS, 1986. Study on sampling method and of mason pine caterpillar, *Dendrolimus punctatus* Walker, and on acreage of individual groups. *Letters in Forest Pest and Disease*, (3): 1 - 4. [李天生, 1986. 马尾松毛虫幼虫抽样方法及个体群面积的研究. 森林病虫通讯, (3): 1 - 4]
- Lu L, Gui H, 1995. Features of RAPD and its application to taxonomy of insect. *Acta Entomol. Sin.*, 38(1): 117 - 121. [鲁亮, 归鸿, 1995. RAPD 技术的特点及其在昆虫分类中的应用. 昆虫学报, 38(1): 117 - 121]
- Meng XZ, Wang HM, 1983. Synthesizing of sex pheromone for *Dendrolimus tabulaeformis* Tsai et Liu and field experiments. *Sci. Silvae Sin.*, 19(2): 137 - 140. [孟宪佐, 王怀敏, 1983. 油松毛虫性诱剂的合成与林间活性试验. 林业科学, 19(2): 137 - 140]
- Wang YW, Jiang SZ, 1999. Study on ocular damage by pine caterpillar. *Chin. J. Ocular Trauma*, 21(3): 187 - 188. [王寅威, 姜素贞, 1999. 松毛虫所致眼部损伤的研究. 眼外伤职业眼病杂志, 21(3): 187 - 188]
- Xiao GR, 1992. Forest Insects of China. 2nd ed. Beijing: China Forestry Publishing House. 944 - 966. [萧刚柔, 1992. 中国森林昆虫. 第二版. 北京: 中国林业出版社. 944 - 966]
- Zhao QS, Wu WB, Lu GP, Yuan X, Li SK, Jiang JC, 1992. Hybridization experiments with two species of *Dendrolimus*. *Acta Entomol. Sin.*, 35(1): 29 - 32. [赵清山, 邹文波, 吕国平, 袁星, 李善奎, 蒋家城, 1992. 松毛虫的杂交遗传试验. 昆虫学报, 35(1): 29 - 32]
- Zhao QS, Wu WB, Lu GP, Chen TF, Lin QY, 1999. Study on cross heredity of pine caterpillars, *Dendrolimus* spp. *Sci. Sil. Sin.*, 35(4): 45 - 50. [赵清山, 邹文波, 吕国平, 陈秦峰, 林庆源, 1999. 松毛虫的种间杂交及其遗传规律的研究. 林业科学, 35(4): 45 - 50]
- Zhang AB, Wang ZJ, Tan SJ, Li DM, 2003. Monitoring *Dendrolimus punctatus* (Walker) (Lepidoptera: Lasiocamidae) with synthetic sex pheromone in Qianshan County, China. *Appl. Entomol. Zool.*, 38(2): 176 - 186.

(责任编辑: 袁德成)