

# 异色瓢虫两个单倍体基因型的生物学特性比较

张欢欢, 李洪冉, 赵日那, 孟玲, 李保平\*

(南京农业大学植物保护学院/农作物生物灾害综合治理教育部重点实验室, 南京 210095)

**摘要:** 单倍体基因型(单倍型)与表型的关系是认识物种适应分化的重要依据。异色瓢虫 *Harmonia axyridis* (Pallas) 有多种单倍型, 我们从南京地区的种群中发现两种优势单倍型(I型和II型), 且这两种单倍型在自然界中数量差异较大。为了探究这两个优势单倍型异色瓢虫生物学特性的差异, 在室内条件下以豌豆修尾蚜 *Megoura japonica* (Matsumura) 为食物, 观察这两个单倍型的幼虫期死亡率和发育历期、雌成虫终身产卵量和卵孵化率等生物学参数。结果表明, 单倍型-I 和单倍型-II 的幼虫发育历期差异显著, 分别为 14.38 和 13.75 d; 单倍型-I 在幼虫各龄期的死亡率均低于单倍型-II, 分别为 13.33%和 29.20%(1龄)、5.49%和 13.75%(2龄)、1.16%和 4.35%(3龄)、2.35%和 10.61%(4龄)。单倍型-I 和单倍型-II 的成虫终身产卵量无显著差异, 分别为 936 粒和 887 粒; 卵孵化率差异显著, 单倍型-I 的卵孵化率(64.53%)高于单倍型-II(60.99%)。综合来看, 异色瓢虫的两个单倍型在自然界存在数量差异的原因可能是其在生殖和发育上的差异造成的。

**关键词:** 基因型; 表型; 生物学; 生存; 生殖

**中图分类号:** S476.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9261(2019)04-0536-06

## Comparison in Life History Traits of Two Haplotypes in *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae)

ZHANG Huanhuan, LI Hongran, ZHAO Rina, MENG Ling, LI Baoping\*

(College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University/Key Laboratory of Integrated Management of Crop Diseases and Pests, Ministry of Education, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** Connecting genotypes and phenotypes improves our understanding of evolution of the organism. *Harmonia axyridis* has a variety of haplotypes, among the haplotypes presented in *H. axyridis*, we screened two dominant haplotypes (I and II) from the population of Nanjing with asymmetric number in natural condition. In order to explore the differences in the biological characteristics of these two dominant haplotypes, we observed the developmental and reproductive performances from egg-hatching to adulthood of these two haplotypes while feeding on the aphid *Megoura japonica* (Matsumura) under laboratory conditions. The results indicated that the larval developmental duration of haplotype-I and haplotype-II was significantly different, which was on average 14.38 d for Haplotype-I and 13.75 d for Haplotype-II. Haplotype-I was lower than Haplotype-II in survivorship across successive larval stages, 13.33% and 29.20% for L1, 5.49% and 13.75% for L2, 1.16% and 4.35% for L3, and 2.35% and 10.61% for L4, respectively. The two haplotypes did not differ in female lifetime fecundity, which was on average 936 eggs per female for Haplotype-I and 887 for Haplotype-II. Haplotype-I was higher than Haplotype-II in hatching rate of eggs, 64.53% for the former and 60.99% for the later. Overall, the difference in the number of two haplotypes of the *H. axyridis* in nature probably be due to differences in reproduction and development.

**Key words:** genotype; phenotype; biology; survivorship; reproduction

收稿日期: 2019-03-22

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFE0104900)

作者简介: 张欢欢, 硕士研究生, E-mail: 1349282933@qq.com; \*通信作者, 教授, E-mail: ml@njau.edu.cn。

DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2019.04.008

线粒体基因是昆虫种下水平的种群结构与遗传多样性研究中重要的分子标记之一<sup>[1]</sup>, 具有许多共有特征, 例如基因组成稳定、基因排列相对保守、普遍为母系遗传、极少发生重组等<sup>[2]</sup>, 因而被广泛用于进化、系统发育、种群遗传结构、基因漂流、杂交和生物地理学等方面的研究<sup>[3]</sup>。线粒体基因通常被认为是适应性进化中的“旁观者”, 越来越多的证据表明, 线粒体基因与生存能力和繁殖力等特征存在关联<sup>[4]</sup>。例如, 对黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 因线粒体基因突变后产生的几种单倍型进行的研究发现, 不同单倍型的果蝇因为线粒体基因编码差异造成线粒体代谢不同, 进而引起果蝇在发育、繁殖和寿命等生物学特性的差异<sup>[5-8]</sup>。但迄今, 除果蝇外, 对其他昆虫的相关研究罕有报道。

异色瓢虫 *Harmonia axyridis* (Pallas) 原产于亚洲东北部, 对蚜虫、蚧虫、叶螨等多种小型害虫具有较强的捕食能力, 是一种重要捕食性天敌<sup>[9]</sup>。在被作为生物防治天敌引入到美洲和欧洲等地后, 虽然对当地蚜害控制发挥了重要作用, 但因威胁本土瓢虫而常被视为外来入侵生物<sup>[10]</sup>。异色瓢虫线粒体基因存在若干单倍型, Zakharov 等<sup>[4]</sup>对异色瓢虫原产地(不包括中国)和入侵地 *mtCOI* 比较分析共鉴定到 13 个单倍型, 其中单倍型 1 数量最多, 分布最广。目前国内对异色瓢虫线粒体基因的研究多集中在系统进化方面, 如郑毅等<sup>[11]</sup>为了探索异色瓢虫色斑变异的规律, 采用 *COI* 和 *COII* 联合分析的方法, 构建了 13 种不同色斑型异色瓢虫的系统发生树。郭长飞等<sup>[12]</sup>以 17 个地区数量较多的异色瓢虫十九斑变型为研究对象, 运用 *COI* 基因序列比对的方法分析了各瓢虫种群之间的系统进化关系。但异色瓢虫中的这些线粒体基因型之间是否存在表型上差异, 尚无研究报道。

我们课题组运用线粒体 *COI* 基因对采自南京地区的异色瓢虫种群进行单倍型分析时发现了两种异色瓢虫优势单倍型: 单倍型-I 和单倍型-II, 且这两种单倍型基因型在自然界中存在数量差异较大(单倍型-II 少于单倍型-I)(未发表资料)。为探究造成这两种单倍型基因型异色瓢虫非随机分布的原因, 在实验室内观察了这两个单倍型的个体发育和生殖特性。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

异色瓢虫成虫和豌豆修尾蚜 *Megoura japonica* (Matsumura) 均于 2018 年 4 月采自南京市玄武区江苏农业科学院野豌豆 *Vicia sepium* L. 上。在养虫室内用盆栽蚕豆 *Vicia faba* (L.) 苗饲养蚜虫, 再用蚜虫饲养异色瓢虫。将异色瓢虫幼虫置于圆形塑料食品盒(直径 15 cm, 高 7.5 cm)内, 提供豌豆修尾蚜为食物, 盒上方用纱布封口, 每盒饲养 10~15 头。将成虫配对置于培养皿内(直径 9 cm), 皿盖开口用纱布封口, 培养皿内铺一张褶皱的牛皮纸(3 cm×5 cm)供其产卵, 待其交配产卵后, 收集卵块放于培养皿内, 培养皿内放一湿润的棉球保湿。卵孵化后, 用毛刷把幼虫放于指形玻璃管并用棉纱封口。用豌豆修尾蚜饲喂, 每天定时更换新鲜食物。养虫室温度为 (25±2) °C, 相对湿度为 65%±5%, 光照强度为 1500 lx, 光周期为 16L:8D。

### 1.2 异色瓢虫单倍型的鉴定

将保存备用的异色瓢虫虫体去翅、足, 并用蒸馏水冲洗清除表面污染, 放入离心管中待用。使用 EasyPure® Genomic DNA Kit (北京全式金生物技术有限公司) 对单头异色瓢虫的基因组 DNA 进行提取, 提取方法按照试剂盒说明书进行。

异色瓢虫 *mtCOI* 基因扩增采用 Folmer 等<sup>[13]</sup>的通用引物序列: LCO1490 5'-GGTCAACAAATCATAAA GATATTGG-3'; HCO2198 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAAATCA-3' (南京金斯瑞生物科技有限公司合成)。PCR 扩增体系为 25 μL, 包括金牌 Mix (green) (北京擎科新业生物技术有限公司) 22 μL、上下游引物各为 1 μL、DNA 模板 1 μL。PCR 扩增程序为: 98 °C 预变性 2 min; 98 °C 10 min, 55 °C 10 s, 72 °C 10 s, 35 个循环; 72 °C 最终延伸 1 min。取 5 μL 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离, 溴化乙锭染色后置于凝胶成像系统中观察结果并拍照记录, 剩余 PCR 反应产物保存于 4 °C 备用。

将 PCR 产物纯化后直接进行测序, 测序工作由南京金斯瑞生物科技有限公司完成, 为确保测序结果的准确性, 均进行双向测序。使用软件 MEGA 5.05<sup>[14]</sup>中的 Clustal W<sup>[15]</sup>, 多序列对位排列程序对获得的 63 条异色瓢虫 *mtCOI* 序列进行比对, 并截取共同的 658 bp 大小的片段。然后使用 DnaSP 5.10<sup>[16]</sup>对所有序列进行单倍型分析, 统计单倍型数目, 单倍型多样性及核酸多样性。

1.3 异色瓢虫发育和生殖观察

将鉴定为单倍型-I 或单倍型-II 的雌性瓢虫成虫的子代在养虫室条件下单独连续饲养 3 代后供试。将异色瓢虫新鲜卵块若干, 放置于培养皿(直径 9 cm)中, 放入湿润棉球保湿。待卵孵化后用毛刷轻取 4 h 内孵化的 1 龄幼虫, 单头放于玻璃试管(直径 20 mm, 高 30 mm)中, 以避免初孵幼虫取食尚未孵化的同胞卵或者营养卵。于每天 8: 00 和 20: 00 观察记录幼虫脱皮和死亡情况, 并补充新鲜豌豆修尾蚜, 直至幼虫化蛹。记录蛹期和成虫羽化时间。单倍型-I 和单倍型-II 分别观察了 105 头和 111 头。

将同日羽化且未交配过的雌、雄虫配对后移至培养皿(直径 9 cm)内, 提供充足豌豆修尾蚜作为猎物, 并放少量新鲜豌豆苗保持湿度。每天更换蚜虫, 待其交配后取走雄虫, 单独饲养雌虫。在培养皿内加放一张褶皱的牛皮纸(3 cm×5 cm)供其产卵, 每天更换蚜虫时取走卵块, 记录产卵量, 直至雌虫停止产卵。将所产卵置于培养皿中, 放入养虫室内(温度 25 ℃±2 ℃、相对湿度 65%±5%、光周期 16L:8D), 观察卵孵化情况。单倍型-I 和单倍型-II 分别观察了 20 对和 27 对。

1.4 数据统计与分析

用广义线性 Poisson 模型分析幼虫发育历期和成虫产卵量, 用 Binomial 模型分析幼虫死亡和卵孵化的概率。用对数似然比卡方测验比较单倍型之间的差异显著性, 以  $\alpha=0.05$  (双尾) 为差异显著性标准。数据分析用 R 统计软件<sup>[17]</sup>。

2 结果与分析

2.1 南京地区异色瓢虫单倍型鉴定

获得的 63 条异色瓢虫的 *mtCOI* 序列中共检测到 7 种单倍型, 编号为 Hap1~Hap7, 其中以单倍型-I (GenBank 登录号 MF973559) 和单倍型-II (GenBank 登录号 MF973560) 的数量占优势, 分别为 44 (69.8%) 和 11 (17.5%) 头; 其他 5 个单倍型均极少。

2.2 异色瓢虫不同单倍型的幼期发育

异色瓢虫幼虫死亡率受单倍型(似然比测验:  $\chi^2=12.55$ ,  $P<0.001$ ) 和龄期( $\chi^2=29.40$ ,  $P<0.001$ ) 显著影响, 但不受两者的互作影响( $\chi^2=0.01$ ,  $P=0.93$ )。单倍型-II 的死亡率在各龄期显著高于单倍型-I, 分别高 15.87% (1 龄)、8.25% (2 龄)、3.18% (3 龄) 和 8.26% (4 龄) (图 1)。

不同单倍型异色瓢虫幼虫的发育历期差异显著( $\chi^2=23.26$ ,  $P<0.001$ )。单倍型-II 发育历期(平均值)比单倍型-I 的延长 15 h (图 2)。

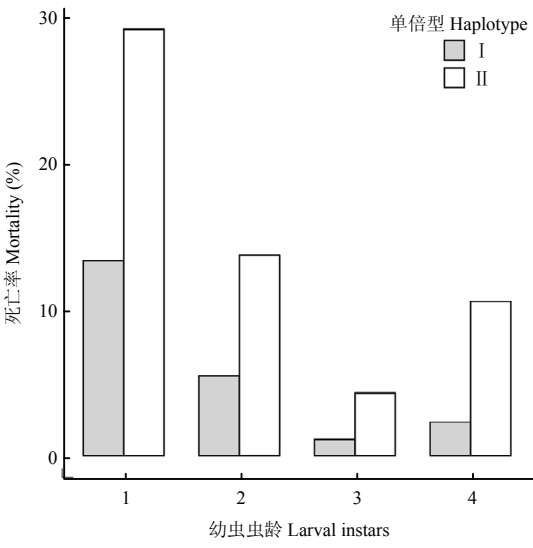


图 1 不同单倍型异色瓢虫各龄期幼虫死亡率

Fig. 1 Proportion of larval mortality across successive stages of the two haplotypes in *H. axyridis*

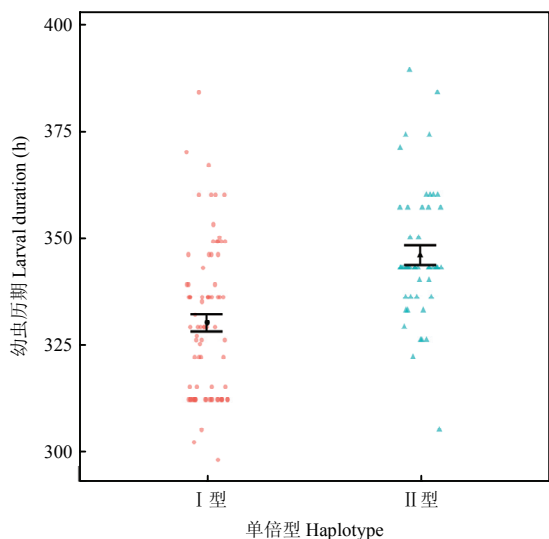


图 2 不同单倍型异色瓢虫幼虫发育历期

Fig. 2 Larval development time of different haplotypes in *H. axyridis*

2.3 异色瓢虫不同单倍型的产卵量

异色瓢虫两个单倍型的雌成虫终身产卵量差异不显著（似然比测验： $\chi^2=2.06$ ， $P=0.56$ ）。单倍型-I 和单倍型-II 的雌成虫终身产卵量（平均值）分别为 936 粒（ $n=26$ ）和 887 粒（ $n=27$ ）（图 3）。

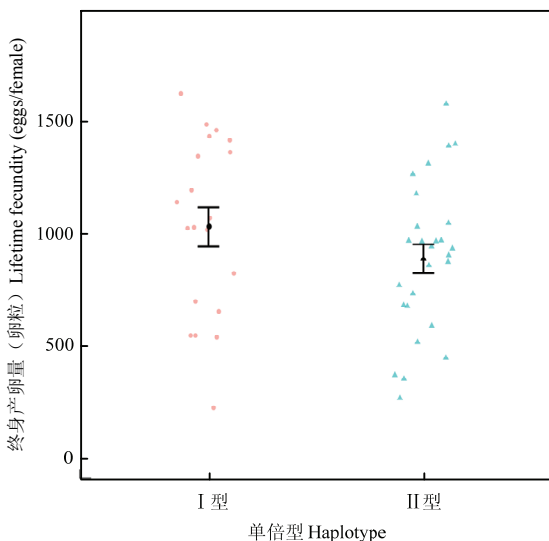


图 3 不同单倍型异色瓢虫终身产卵量

Fig. 3 Lifetime fecundity of different haplotypes in *H. axyridis*

2.4 异色瓢虫不同单倍型的卵孵化率

异色瓢虫不同单倍型的卵孵化率差异显著（似然比测验， $\chi^2=29.23$ ， $P<0.001$ ）。单倍型-I 和单倍型-II 的卵孵化率（平均值）分别为 64.53%（ $n=26$ ）和 60.99%（ $n=27$ ）（图 4）。

3 讨论

本研究发现异色瓢虫两个单倍型幼虫的各龄期死亡率、发育历期和卵孵化率有显著差异，雌成虫总产卵量没有显著差异。该结果说明，两种单倍型基因型异色瓢虫的非随机分布受幼虫死亡率、发育历期和卵孵化率的影响。

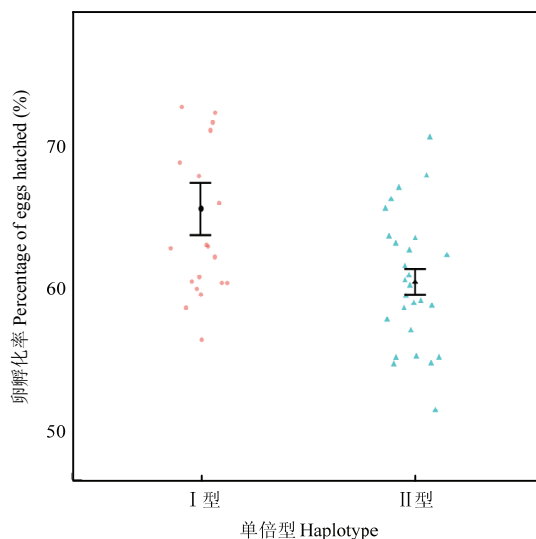


图 4 不同单倍型异色瓢虫的卵孵化率

Fig. 4 Egg-hatching rate of different haplotypes in *H. axyridis*

mtDNA 可以通过影响线粒体代谢进而影响生物的生物学特性<sup>[18]</sup>。有研究表明不同单倍型的黑腹果蝇的发育时间<sup>[19]</sup>和耐饥饿能力不同<sup>[20]</sup>。以此推测, 异色瓢虫两个单倍型之间在幼虫存活上的差异可能与耐饥饿能力的不同有关; 耐饥能力的差异对低龄幼虫比对高龄幼虫的影响更大, 从而使两种单倍型瓢虫幼虫的存活在低龄比高龄期的差异更大。在自然界中, 蚜虫种群在空间和时间维度上的异质性很大<sup>[21]</sup>, 瓢虫幼虫的活动能力相对于成虫(可飞行)较为有限, 故瓢虫在野外偶尔遭遇缺乏蚜虫猎物的饥饿情况是常态。所以, 与单倍型-I 相比, 耐饥能力较弱的单倍型-II 的死亡率较高、发育历期较长, 从而导致种群中单倍型-I 的数量多于单倍型-II。在我们观察到单倍型-I 的死亡率低于单倍型-II, 与各自在种群中的占比是一致的。

许多物种的精子活力与线粒体的代谢有关, mtDNA 突变能影响精子的大小和运动性<sup>[22,23]</sup>。有证据表明, 生物的 mtDNA 与其繁殖力有关, 其影响可能与雄性精子质量有关, 而与雌性无关<sup>[24]</sup>。除了昆虫, mtDNA 突变也可对人类男性精子活力产生负面影响, 从而影响生育能力<sup>[25,26]</sup>。因此我们推测, 异色瓢虫两个单倍型之间在卵孵化率上存在差异, 可能是由于 mtDNA 突变对雄虫的精子质量产生了影响。

本研究对异色瓢虫的两个单倍型之间生活史特征的比较, 发现其非随机分布可能与其生殖和发育的差异有关, 但目前只对一个地理种群进行研究, 有待于在更多地理种群中进行验证。而且, 由于环境胁迫是重要的选择压力, 故有必要进一步研究异色瓢虫的单倍型之间在抗逆能力上的差异。

**致谢:** 感谢南京农业大学植物保护学院害虫生物防治研究室陈勇博士协助分析数据。

### 参 考 文 献

- [1] 魏书军, 陈学新. 昆虫比较线粒体基因组学研究进展[J]. 应用昆虫学报, 2011, 48(6): 1573-1585.
- [2] Wolstenholme D R. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution[J]. International Review of Cytology, 1992, 141(1): 173-216.
- [3] Wilson A C, Cann R L, Carr S M, *et al.* Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics[J]. Biological Journal of the Linnean Society, 1985, 26(4): 375-400.
- [4] Zakharov I A, Goryacheva I I, Romanov D A, *et al.* Mitochondrial polymorphism in invasion and native populations of *Harmonia axyridis*[J]. Russian Journal of Genetic, 2018, 1(1): 15-18.
- [5] Katewa S D, Ballard J W O. Sympatric *Drosophila simulans* flies with distinct mtDNA show age related differences in mitochondrial metabolism Sympatric *Drosophila simulans*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 37(9): 923-932.
- [6] Aw W C, Correa C C. Mitochondrial DNA variants in *Drosophila melanogaster* are expressed at the level of the organismal phenotype[J]. Mitochondrion, 2011, 11(5): 756-763.

- [7] Pichaud N, Ballard J W O, Tanguay R M. Mitochondrial haplotype divergences affect specific temperature sensitivity of mitochondrial respiration[J]. *Jornal of Bioenergetics and Biomembranes*, 2013, 45(1-2): 25-35.
- [8] Camus M F, Wolf J B W, Morrow E H, *et al.* Single nucleotides in the mtDNA sequence modify mitochondrial molecular function and are associated with sex-specific effects on fertility and aging mtDNA[J]. *Current Biology*, 2015, 25: 2717-2722.
- [9] Koch R L. The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: a review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts[J]. *Jornal of Insect Science*, 2003, 3(1): 1-16.
- [10] Roy H E, Brown P M. Ten years of invasion: *Harmonia axyridis* (pallas) (Coleptera: Coccinellida) in Britain[J]. *Ecological Entomology*, 2015, 40(4): 336-348.
- [11] 郑毅, 迟德富, 杜波, 等. 不同色斑型异色瓢虫 *COI* 和 *COII* 基因序列系统进化分析[J]. *昆虫知识*, 2009, 46(6): 866-873.
- [12] 郭长飞, 许炜明, 何瞻, 等. 异色瓢虫色斑多样性调查及各地十九斑变型 *CO I* 基因系统进化分析[J]. *植物保护学报*, 2016, 43(1): 155-161.
- [13] Folmer O, Black M, Hoeh W, *et al.* DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates[J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, 3(5): 294-299.
- [14] Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: molecular, evolutionary, genetics, analysis, using maximum, likelihood, evolutionary, distance, and maximum, parsimony, methods[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [15] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J, *et al.* CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice[J]. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22: 4673-4680.
- [16] Rozas J, Sanchez-Delbarrio J C, Peypoch X M, *et al.* DnaS. DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods[J]. *Bioinformatics*, 2004, 19(18): 2496-2497.
- [17] R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing.R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.URL, 2017, <https://www.R Project.org/>.
- [18] Katewa S D, Ballard J W O. Sympatric *Drosophila simulans* flies with distinct mtDNA show difference in mitochondrial respiration and electron transport[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 37(3): 213-222.
- [19] James A C, Ballard J W O. Mitochondrial genotype affects fitness in *Drosophila simulans*[J]. *Genetics*, 2003, 164(1): 187-194.
- [20] Matsuura E T, Fukda H, Chigusa S I. Mitochondrial DNA heteroplasmy maintained in natural populations of *Drosophila simulans* in Reunion[J]. *Gentical Research*, 1991, 57(2): 123-126.
- [21] Dixon A F G. Insect Predator-Prey Dynamics: Ladybird Beetles and Biological Control[M]. Cambridge University Press, 2000, 257.
- [22] Ingvarsson P K. Restoration of genetic variation lost-The genetic rescue hypothesis[J]. *Trends in Ecology and Evolution*, 2001, 16(2): 62-63.
- [23] Kaneda H, Hayashi J I, Takahama S, *et al.* Elimination of paternal mitochondria-DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis[J]. *Proceedings of the National Academy of The United States of America*, 1995, 92(10): 4542-4546.
- [24] Gemmell N J, Metcalf V J, Allendorf F W. Mother's curse: the effect of mtDNA on individual fitness and population viability[J]. *Trends in Ecology and Evolution*, 2004, 19(5): 238-244.
- [25] Birkhead T R, Martinez J G, Burke T, *et al.* Sperm mobility determines the outcome of sperm competition in the domestic fowl[J]. *Proceeding of The Royal Society B-Biological Sciences*, 1999, 266(1430): 1759-1764.
- [26] Ruiz-Pesini E, Mismar D, Brand M, *et al.* Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA[J]. *Science*, 2004, 303(5655): 223-226.