

doi: 10.3969/j.issn.1674-0858.2016.03.9

赤拟谷盗和杂拟谷盗的生殖隔离研究

沈加飞, 程 超, 明庆磊*

(江苏师范大学生命科学学院, 江苏徐州 221116)

摘要: 赤拟谷盗和杂拟谷盗是两个同域发生的近缘储粮害虫。为明确它们的生殖隔离程度和机制, 本研究比较分析了赤拟谷盗和杂拟谷盗雄虫对同种和异种雌虫的交配选择; 赤拟谷盗与杂拟谷盗交配后, 测定了精子在异种雌体内的存活情况; 将赤拟谷盗和杂拟谷盗进行正反杂交, 研究其 F₁ 代、F₂ 代和回交代杂种是否产生及其雌雄比。结果显示, 赤拟谷盗和杂拟谷盗雄虫对同种雌虫的爬跨率和交配率高于其对异种雌虫的爬跨率和交配率, 表明赤拟谷盗和杂拟谷盗种间性隔离不完全; 赤拟谷盗和杂拟谷盗交配后精子在异种雌体内是存活的, 杂交所产的 F₁ 代卵为受精卵, 说明交配后完成了精子传送和受精过程, 表明种间机械隔离和配子隔离不完全; 赤拟谷盗和杂拟谷盗的杂种 F₁ 代自交和回交产生了 F₂ 代和回交代, 表明种间不存在杂种不育; 一些杂交组合产生的 F₂ 代和回交代数量少且存在雌雄性比偏离, 表明种间存在部分杂种不活和杂种衰败。本研究明确了赤拟谷盗和杂拟谷盗的生殖隔离机制, 这对于揭示它们的物种进化关系有着重要意义。

关键词: 赤拟谷盗; 杂拟谷盗; 交配选择; 种间杂交; 生殖隔离

中图分类号: Q963; S433.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-0858 (2016) 03-0508-06

Study on reproductive isolation between *Tribolium castaneum* and *T. confusum*

SHEN Jia-Fei, CHENG Chao, MING Qing-Lei* (School of Life Sciences, Jiangsu Normal University, Xuzhou 221116, Jiangsu Province, China)

Abstract: The red flour beetles *Tribolium castaneum* (Herbst) and the confused flour beetles *T. confusum* (Jac. du Val.) are two closely related sympatric stored-grain pests. In this study, to clarify the degree and mechanism of reproductive isolation between them, we made a comparison and analysis of behavioral responses of males *T. castaneum* and *T. confusum* to conspecific and heterospecific females. The sperm viability in heterospecific female was detected after interspecific copulation. In the laboratory, *T. castaneum* and *T. confusum* beetles were forced to hybridize in reciprocal crosses, and the number and the proportion of male and female in the F₁, F₂ and backcrosses hybrids were recorded. Results showed that, responses of males *T. castaneum* and *T. confusum* to conspecific females were higher than to heterospecific females, suggesting that sexual isolation between them was incomplete. The sperm in heterospecific females were live after interspecific copulation, and also the two species were able to hybridize and produce the reciprocal F₁ hybrids, suggesting that mechanical isolation and gametic isolation were both incomplete. The F₁ hybrids were able to cross and produce F₂ hybrids and backcrosses, suggesting that hybrid sterility were not present. However, some combinations produced fewer backcrosses and F₂ hybrids with a skewed sex ratio. The few offspring and skewed sex ratio might be due to the inviability of some F₂ hybrids and backcrosses, and hybrid inviability and hybrid breakdown existed to a certain extent. All in all, studies on the mechanism of reproductive isolation between *T. castaneum* and *T. confusum* help to improve the understanding of their evolutionary relationships.

基金项目: 国家自然科学基金 (31172159); 江苏师范大学自然科学基金重点项目 (13XLA06)

作者简介: 沈加飞, 男, 1990 年生, 江苏盐城人, 硕士生, 研究方向为昆虫遗传与进化, E-mail: shenjiafei0118@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: mingqinglei@jsnu.edu.cn

收稿日期 Received: 2015-11-08; 接受日期 Accepted: 2015-12-04

Key words: *Tribolium castaneum*; *Tribolium confusum*; mating choice; interspecific hybridization; reproductive isolation

自达尔文进化论问世以来,物种形成一直是进化生物学家研究关注的中心理论问题之一 (Ritchie, 2007)。物种形成是指物种的分化产生,即从一个种内产生出另一个新种的过程,其大致要经过三个阶段: 由于基因突变、染色体变异和基因重组,使种群中产生可遗传的变异; 自然选择等因素作用于可遗传的变异,使种群的遗传结构发生了改变; 不同种群由于生殖隔离而加深了性状分歧,逐渐形成新种 (Wu, 2001)。物种形成过程所经历时间往往很漫长,因而无法对其进行直接观察,所以研究物种形成常常是通过鉴定近缘种群,研究其生殖隔离机制,从而解释种群的演变 (Tregenza, 2002)。

昆虫是动物界中最大的一个类群,在自然界中种类多、分布广,探究其种间生殖隔离机制有助于理解物种形成的模式和过程。研究昆虫种间的生殖隔离不仅在理论上具有重大意义,在实践上也有重要价值 (王琛柱, 2006)。例如,可以根据昆虫种间或种群间的生殖隔离机制找到一些办法干扰其交配选择,使其找错配偶或找不到配偶,造成其不能正常繁殖,从而达到控制害虫的目的。

赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* Herbst 和杂拟谷盗 *Tribolium confusum* Jac. du Val. 均属鞘翅目 Coleoptera 拟步甲科 Tenebrionidae 拟谷盗属 *Tribolium*, 它们外部形态和生活习性相似,是两种重要的世界性储粮近缘种害虫,常给农业生产造成巨大的经济损失 (Campbell *et al.*, 2004)。目前,使用化学农药是防治赤拟谷盗和杂拟谷盗的重要手段,但由于化学杀虫剂的大量使用,它们的耐药性逐渐提高,防治更加困难,同时也存在农药残留问题,因此探寻绿色、安全、高效的生物防治方法将是今后害虫综合防治的主要策略 (Campbell, 2012)。赤拟谷盗在我国各地的面粉厂、饲料厂和粮食仓库等均有发生,杂拟谷盗在我国大部分地区也有发生,虽地理分布不及赤拟谷盗广,但是其栖息场地和赤拟谷盗相似,并常与赤拟谷盗混合发生 (张生芳和周玉香, 2002)。因此,很有必要搞清赤拟谷盗和杂拟谷盗种间是否存在性隔离,种间交配后精子能否存活,种间

杂交能否产生杂种后代,是否存在杂种不育、杂种不活和杂种衰败等。探究赤拟谷盗和杂拟谷盗的生殖隔离机制,不仅在理论上具有重要的意义,在实际应用中也有潜在价值,可能为拟谷盗的生物防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

所用赤拟谷盗 (CS) 和杂拟谷盗 (CF) 为实验室种群,置于温度 29℃、相对湿度 70% 的恒温恒湿培养箱中,饲以全麦面粉 (山东潍坊风筝面粉厂生产)。两种试虫均在蛹期鉴别雌雄并分开饲养,羽化后待用。

1.2 赤拟谷盗与杂拟谷盗的交配行为实验

交配行为实验分为无选择交配实验 (1 ♂ CS 对 1 ♀ CS、1 ♂ CS 对 1 ♀ CF、1 ♂ CF 对 1 ♀ CF、1 ♂ CF 对 1 ♀ CS 共 4 个组合) 和有选择交配实验 (1 ♂ CS 对 1 ♀ CS 和 1 ♀ CF、1 ♂ CF 对 1 ♀ CS 和 1 ♀ CF 共 2 个组合), 每个组合设置 45 个重复。将雌雄成虫放在一个底部带有划痕的塑料培养皿 (直径 3.5 cm, 高为 0.6 cm) 交配场中 30 min, 观察并记录它们的接触、爬跨和交配行为 (图 1), 实验环境为 25℃ 和 70% RH。在有选择交配实验中,实验前两天用 Marker 金笔在雌性赤拟谷盗或杂拟谷盗成虫鞘翅上标记一个小点,以区分交配场中的雌性赤拟谷盗和杂拟谷盗。



图 1 赤拟谷盗的交配行为

Fig. 1 The copulation behavior of *Tribolium castaneum*

1.3 赤拟谷盗与杂拟谷盗杂交后精子死活的测定

将雄赤拟谷盗和雌杂拟谷盗放到塑料培养皿中，待交配完成后将雌杂拟谷盗单独饲养 24 h，然后解剖雌杂拟谷盗取出其受精囊并将精子释放悬浮于 HEPES 缓冲生理盐水中（10 mM HEPES，150 mM NaCl，10% BSA，pH7.4），采用荧光染色试剂盒 Live/Dead Sperm Viability Kit（Molecular Probes，Eugene，OR，USA）检测精子的死活，具体步骤参照试剂盒说明书。在荧光显微镜下，活精子和死精子的头部分别发出绿色荧光和红色荧光。

1.4 赤拟谷盗与杂拟谷盗的杂交实验

杂交实验的设计方案见图 2。将 30 头雄性成虫与 30 头异种雌性成虫混合饲养，进行正反杂

交，3 d 后每天筛出试虫将其放入装有面粉的新瓶中继续产卵并保留旧瓶中的面粉，共收集 10 d。待面粉中的卵发育成蛹后进行雌雄鉴定并记录羽化后的雌雄个数。用上述正反交实验中获得杂种 F1 代进行自交和回交以获得 F2 代和回交代，同样方法进行雌雄鉴定和雌雄计数。杂交实验及其杂种后代的饲养均在同上的恒温恒湿培养箱中进行。

1.5 数据统计与分析

使用 SPSS 13.0 软件，对交配行为数据和杂种后代的雌雄比数据进行卡方检验分析，以检验是否存在种间交配选择和杂种后代性偏离。使用 JMATING 软件（Carvajal-Rodriguez and Rolan-Alvarez，2006）计算性隔离指数（ I_{PSI} ），对种间性隔离程度进行量化分析。

2 结果与分析

2.1 赤拟谷盗和杂拟谷盗的种内和种间交配选择

无选择交配实验（表 1）和有选择交配实验（表 2）均表明赤拟谷盗和杂拟谷盗雄虫对同种和异种雌虫都进行了接触，雄虫对雌虫的种内和种间接触率无差异（ $P > 0.05$ ），但是赤拟谷盗和杂拟谷盗雄虫对同种雌虫的爬跨率和交配率显著高于其对异种雌虫（ $P < 0.01$ ），这说明赤拟谷盗和杂拟谷盗雄虫均倾向于选择同种雌虫进行交配。无选择交配实验和有选择交配实验的 I_{PSI} 分别为 0.64 和 0.80，表明赤拟谷盗与杂拟谷盗种间性隔离不完全。



图 2 赤拟谷盗和杂拟谷盗的杂交设计方案（雄 × 雌）

Fig. 2 Hybridization scheme of *Tribolium castaneum* (CS) and *T. confusum* (CF) (male × female)

表 1 赤拟谷盗和杂拟谷盗雄虫对同种和异种雌虫的无选择行为反应

Table 1 No-choice behavioral responses percentage of males *Tribolium castaneum* (CS) and *T. confusum* (CF) to conspecific and heterospecific virgin female

行为反应（雄对雌） Behavioral response of male to female	重复数 N	接触（%） Contact	爬跨（%） Mount	交配（%） Copulation
赤拟谷盗对赤拟谷盗 CS to CS	45	100 a	49 a	44 a
赤拟谷盗对杂拟谷盗 CS to CF	45	100 a	9 b	7 b
杂拟谷盗对杂拟谷盗 CF to CF	45	100 a	53 a	45 a
杂拟谷盗对赤拟谷盗 CF to CS	45	100 a	20 b	13 b

注：同列中数据后标注不同的字母表示差异显著（ $P < 0.01$ ）。Note: Data followed by different letters in the same column are statistically significant（ $P < 0.01$ ）.

表 2 赤拟谷盗和杂拟谷盗雄虫对同种和异种雌虫的有选择行为反应
Table 2 Male mate choice responses percentage of *Tribolium castaneum* (CS) and *T. confusum* (CF) to intraspecific and interspecific virgin females

行为反应 (雄对雌) Behavioral response of male to females	重复数 N	种内和种间 Intraspecies and interspecies					
		接触 (%) Contact		爬跨 (%) Mount		交配 (%) Copulation	
赤拟谷盗对赤拟谷盗和杂拟谷盗 CS to CS and CF	45	100 a	100 a	36 a	4 b	32 a	3 b
杂拟谷盗对赤拟谷盗和杂拟谷盗 CF to CS and CF	45	100 a	100 a	31 a	8 b	29 a	5 b

注: 同行或同列中的数据后标注不同的字母表示差异显著 ($P < 0.01$)。Note: Data followed by different letters in the same line or column are statistically significant ($P < 0.01$).

2.2 赤拟谷盗和杂拟谷盗杂交后精子死活的测定结果

在荧光显微镜下观察到雌杂拟谷盗体内受精囊里的赤拟谷盗精子头部发出绿色荧光 (图 3), 这表明种间交配后精子在异种雌体内是存活的。

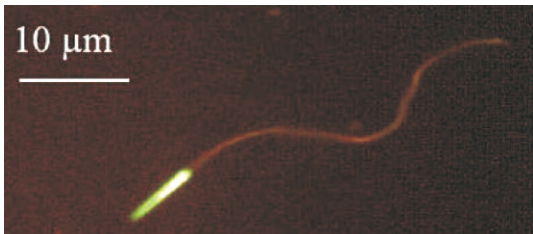


图 3 赤拟谷盗精子存活的荧光染色
Fig. 3 Sperm viability of *Tribolium castaneum* measured by fluorescent staining

2.3 赤拟谷盗和杂拟谷盗的杂交实验结果

赤拟谷盗和杂拟谷盗各杂交组合均产生了 F1、F2 和回交杂种后代 (表 3)。赤拟谷盗和杂拟谷盗种间正反交所产的 F1 代卵孵化, 表明种间交配后完成了精子传送和受精过程, 赤拟谷盗与杂拟谷盗种间机械隔离和配子隔离不完全。赤拟谷盗和杂拟谷盗的杂种 F1 代自交和回交各组合均产生了 F2 代和回交代, 这说明种间不存在杂种不育。赤拟谷盗和杂拟谷盗种间杂交产生 F2 代和有些回交代的杂种后代数量少且雌雄性比偏离, 这说明种间存在部分杂种不活和杂种衰败。

2.4 赤拟谷盗和杂拟谷盗的种间生殖隔离机制

根据以上的实验结果, 总结出赤拟谷盗与杂拟谷盗的种间生殖隔离机制 (表 4), 具体阐述详见讨论部分。

表 3 赤拟谷盗与杂拟谷盗的杂交结果
Table 3 Hybridization results of *Tribolium castaneum* (CS) and *T. confusum* (CF)

杂种类型 Types of hybrids	杂交组合 (雄 × 雌) Crosses (male × female)	杂种数 (雌/雄) Number of hybrids (female/male)	性比 (雌/雄) Sex ratio (female/male)	χ^2	P
F1	CS × CF	218/253	0.86	1.304	0.254
F1	CF × CS	183/182	1.01	0.001	0.970
F2	CSCF × CSCF	80/49	1.63	3.794	0.041
F2	CFCS × CFCS	65/70	0.93	0.093	0.760
回交 Backcross	CSCF × CS	120/115	1.04	0.053	0.817
回交 Backcross	CS × CSCF	127/132	0.96	0.048	0.826
回交 Backcross	CSCF × CF	92/78	1.18	0.577	0.447
回交 Backcross	CF × CSCF	98/92	1.07	0.095	0.758
回交 Backcross	CFCS × CS	202/207	0.98	0.031	0.861
回交 Backcross	CS × CFCS	101/90	1.12	0.318	0.573
回交 Backcross	CFCS × CF	46/45	1.02	0.006	0.941
回交 Backcross	CF × CFCS	45/40	1.13	0.148	0.700

注: 杂交组合见图 2。Note: The interspecific crosses are shown in Fig. 2.

表 4 赤拟谷盗与杂拟谷盗的种间生殖隔离机制
Table 4 Mechanism of reproductive isolation between *Tribolium castaneum* and *T. confusum*

生殖隔离类型 Types of reproductive isolation	是否存在及其程度 Whether it exists or not, and its degree
生态隔离 Habitat isolation	否
时间隔离 Temporal isolation	否
性隔离 Sexual isolation	存在, 不完全
机械隔离 Mechanical isolation	存在, 不完全
配子隔离 Gametic isolation	存在, 不完全
杂种不活 Hybrid inviability	存在, 不完全
杂种不育 Hybrid sterility	否
杂种衰败 Hybrid breakdown	存在, 不完全

3 结论与讨论

根据隔离作用发生时间的不同, 生殖隔离可分为交配前隔离和交配后隔离两大类 (Sawamura and Tomaru, 2002)。交配前隔离主要包括生态隔离、时间隔离、性隔离和机械隔离等类型; 交配后隔离主要包括配子隔离、杂种不活、杂种不育和杂种衰败等类型。

赤拟谷盗和杂拟谷盗同域分布且其栖息场地和生活习性相似, 二者在面粉厂和储粮仓库常混合发生 (张生芳和周玉香, 2002), 因此赤拟谷盗和杂拟谷盗种间不存在生态隔离和时间隔离。有研究表明, 一些近缘种或种群的生殖隔离是由于生活在同一区域内的不同生境内而造成的不能交配, 或由于交配时间段的差异而不能交配。金翅夜蛾亚科的两个近缘种 *Autographa gamma* 和 *Cornutiplusia circumflexa* 在以色列是同域发生的, 前者主要为害马铃薯和芹菜, 后者主要为害茄科植物, 二者存在着生态隔离 (Mazor and Dunkelblum, 2005)。欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis* 有 E 系和 Z 系, E 系取食啤酒花和蒿, Z 系取食玉米, 它们之间存在生态隔离 (Bethenod *et al.*, 2005)。同域分布的专食性近缘种跳甲 *Altica fragariae* 和 *A. viridicyanea* 因寄主专化而存在生态隔离 (Xue *et al.*, 2009)。沙漠甲虫近缘种 *Trigonoscelis gigas* 和 *T. sublaevicollis* 存在时间隔离, 前者在黎明活动, 而后者在晚上活动 (Zotov,

2009)。同样, 果蝇 *Drosophila melanogaster* 和 *D. simulans* 交配的时辰节律不同, *D. melanogaster* 在下午不活跃, 而 *D. simulans* 在上午不活跃, 二者存在时间隔离 (Sakai and Ishida, 2001)。

尽管赤拟谷盗和杂拟谷盗雄虫对同种雌虫的爬跨率和交配率显著高于其对异种雌虫的爬跨率和交配率, 但是赤拟谷盗和杂拟谷盗雄虫对异种的雌虫仍然存在爬跨和交配, 这说明赤拟谷盗和杂拟谷盗种间交配行为时有发生, 因此赤拟谷盗和杂拟谷盗种间性隔离不完全。雌雄交配存在着所谓“锁钥假说”, 昆虫的种类不同其外生殖器的构造往往有差异, 因此种间交配并不意味着能成功地进行精子传送 (Mutanen *et al.*, 2006)。实验结果表明, 尽管赤拟谷盗与杂拟谷盗种间交配率较低, 但正反种间杂交均可产生 F1 杂种后代, 这说明赤拟谷盗与杂拟谷盗完成了交配和交配后的精子传送, 因此赤拟谷盗和杂拟谷盗种间机械隔离不完全。赤拟谷盗与杂拟谷盗的雌性成虫无论是否交配均会产卵, 但是未交配者所产的卵为未受精卵, 不能孵化, 而交配者所产的卵为受精卵, 能孵化并正常发育。在赤拟谷盗与杂拟谷盗种间正反交所产的 F1 代卵孵化, 说明所产卵为受精卵, 因此种间配子隔离不完全。Sweigart (2010) 报道雌 *Drosophila virilis* 和雄 *D. americana* 杂交后很难获得杂种后代是由于 *D. americana* 的精子在 *D. virilis* 输卵管中存活率低且与卵子不亲和, 即存在配子隔离。

赤拟谷盗和杂拟谷盗种间正反杂交能产生 F1 代, 且 F1 代能进行自交或与亲本进行回交产生 F2 代和回交代, 这说明赤拟谷盗和杂拟谷盗种间不存在杂种不育; 但在某些组合中存在着产生的杂种后代数较少和雌雄性比偏离, 这说明赤拟谷盗和杂拟谷盗种间存在着部分杂种不活和部分杂种衰败。雄棉铃虫和雌烟青虫杂交能产生正常可育的雄蛾和雌蛾, 但是雌棉铃虫和雄烟青虫杂交只产生正常可育的雄蛾和一些畸形个体, 出现这种部分杂种不育和正反交组合的不对称与霍尔登氏法则的推论相吻合, 即两个种群杂交产生的后代, 缺失、稀有或者不育的那个性别是异配性别 (Wang and Dong, 2001)。棉铃虫和烟青虫的杂种 F1 代进行自交和回交产生了 F2 代和 6 个组合的回交代, 其中 F2 代和 4 个组合的回交代雌雄比正常, 但有 2 个组合的回交代雌雄比偏离, 这种性偏离是由于一些杂种回交后代的不存活或杂种衰败所

致 (Zhao *et al.* , 2005)。

总之, 本研究明确了赤拟谷盗和杂拟谷盗的生殖隔离机制, 发现它们之间具有很近的亲缘关系。未来应从形态特征、生殖隔离程度、比较基因组和转录组等方面对其进行整合研究, 进一步阐明赤拟谷盗和杂拟谷盗的物种进化关系。

参考文献 (References)

- Bethenod MT , Thomas Y , Rousset F , *et al.* Genetic isolation between two sympatric host plant races of the European corn borer , *Ostrinia nubilalis* Hübner. II : Assortative mating and host plant preferences for oviposition [J]. *Heredity* , 2005 , 94: 264 – 270.
- Campbell JF , Arthur FH , Mullen MA. Insect management in food processing facilities [J]. *Advances in Food and Nutrition Research* , 2004 , 48: 239 – 295.
- Campbell JF. Attraction of walking *Tribolium castaneum* adults to traps [J]. *Journal of Stored Products Reserch* , 2012 , 51: 11 – 22.
- Carvajal – Rodriguez A , Rolan – Alvarez E. JMATING: A software for the analysis of sexual selection and sexual isolation effects from mating frequency data [J]. *BMC Evolutionary Biology* , 2006 , 6: 40.
- Mazor M , Dunkelblum E. Circadian rhythms of sexual behavior and pheromone titers of two closely related moth species *Autographa gamma* and *Cornutiplusia circumflexa* [J]. *Journal of Chemical Ecology* , 2005 , 31: 2153 – 2168.
- Mutanen M , Kaitala A , Monkkonen M. Genital variation within and between three closely related *Euxoa* moth species: Testing the lock-and-key hypothesis [J]. *Journal of Zoology* , 2006 , 268: 109 – 119.
- Ritchie MG. Sexual selection and speciation [J]. *Annual Review of Ecology and Systematics* , 2007 , 38: 79 – 102.
- Sakai T , Ishida N. Circadian rhythms of female mating activity governed by clock genes in *Drosophila* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 2001 , 98: 9221 – 9225.
- Sawamura K , Tomaru M. Biology of reproductive isolation in *Drosophila*: Toward a better understanding of speciation [J]. *Population Ecology* , 2002 , 44: 209 – 219.
- Sweigart AL. The genetics of postmating prezygotic reproductive isolation in *Drosophila* [J]. *Genetics* , 2010 , 184: 401 – 410.
- Tregenza T. Divergence and reproductive isolation in the early stages of speciation [J]. *Genetica* , 2002 , 116: 291 – 300.
- Wang CZ , Dong JF. Interspecific hybridization of *Helicoverpa armigera* and *H. assulta* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Chinese Science Bulletin* , 2001 , 46 (6) : 489 – 491.
- Wang CZ. Understanding the biological species concept from the interspecific hybridization of *Helicoverpa armigera* and *H. assulta* [J]. *Chinese Science Bulletin* , 2006 , 51: 2573 – 2575. [王琛柱. 从棉铃虫和烟青虫的种间杂交理解生物学物种概念 [J]. 科学通报 , 2006 , 51: 2573 – 2575]
- Wu CL. The genic view of the process of speciation [J]. *Journal of Evolutionary Biology* , 2001 , 14: 851 – 865.
- Xue HJ , Magalhaes S , Li WZ , *et al.* Reproductive barriers between two sympatric beetle species specialized on different host plants [J]. *Journal of Evolutionary Biology* , 2009 , 22: 2258 – 2266.
- Zhang SF , Zhou YX. Distribution , host and identification of the important *Tribolium* species [J]. *Plant Quarantine* , 2002 , 6: 349 – 351. [张生芳 , 周玉香. 拟谷盗属重要种的分布 , 寄主及鉴别 [J]. 植物检疫 , 2002 , 6: 349 – 351]
- Zhao XC , Dong JF , Tang QB , *et al.* Hybridization between *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa assulta* (Lepidoptera: Noctuidae) : Development and morphological characterization of F1 hybrids [J]. *Bulletin of Entomological Research* , 2005 , 95: 409 – 416.
- Zotov VA. Circadianrhythm of activity as a factor of reproductive isolation in closely related species of sand-desert *Tenebrionid* Beetles (Coleoptera: Tenebrionidae) [J]. *Entomological Review* , 2009 , 89: 1 – 4.