



# 为害新疆春小麦的黑角负泥虫形态鉴定与 *COI*基因序列分析

哈帕孜·恰合班<sup>1\*</sup>, 张鹏飞<sup>3\*</sup>, 郭家洛<sup>2</sup>, 代丽珍<sup>2</sup>, 王进忠<sup>2\*\*</sup>,  
吐尔逊·那吾尔孜拜<sup>1</sup>, 任争光<sup>1</sup>, 武延生<sup>3</sup>

(1. 新疆青河县农业技术推广中心, 阿勒泰 836200; 2. 北京农学院生物与资源环境学院, 农业农村部华北都市农业重点实验室, 北京 102206; 3. 邢台学院化学工程与生物技术学院, 河北省“邢枣仁”利用技术创新中心, 河北邢台 054000)

**摘要:** 为了明确来自中国新疆青河县危害春小麦的一种负泥虫的种类, 对其成虫外部形态和生殖器官结构进行了观察, 并分析了其线粒体 *COI* 基因序列和单倍型。结果显示, 成虫体长 4.98~5.61 mm, 头部深蓝色, 触角黑色 11 节, 前胸背板橙红色。鞘翅长 3.44~3.67 mm, 每侧具 10 列由密而深刻点组成的条纹。腿节(除基部)、胫节(除端部)为橙红色, 其余为黑色。雄性阳茎内的插入器(鞭毛)粗壮略短, 长 518.99  $\mu\text{m}$ , 宽 86.29  $\mu\text{m}$ , 轻微弯曲。雌性受精囊导管在近端部硬化严重, 长 496.95  $\mu\text{m}$ , 盘曲折叠 1 圈。这些外部形态特征和生殖器结构与黑角负泥虫 *Oulema melanopus* 相符。线粒体 *COI* 序列分析结果显示, 与来自其他国家的 11 只黑角负泥虫 *COI* 序列的遗传距离范围为 0~0.091, 系统发育表明与黑角负泥虫、*O. mauroi* 和 *O. duftschmidi* 的亲缘关系最近, 单倍型分析结果显示, 本序列单独属于一个单倍型。

**关键词:** 新疆青河县; 负泥虫; 外部形态; 生殖器; *COI* 基因序列分析

中图分类号: Q963

文献标识码: A

## Morphological identification and *COI* gene sequence analysis of the cereal leaf beetle *Oulema melanopus* (Chrysomelidae: Criocerinae) infesting spring wheat in Xinjiang, China

基金项目: 新疆青河县基层农技推广体系建设项目; 北京市自然科学基金与北京市教育委员会科技计划重点项目 (KZ 201810020026); 北京市自然科学基金 (6182002); 国家自然科学基金项目 (31272099); 中央引导地方科技发展资金项目 (236Z2902G)

\*共同第一作者: 哈帕孜·恰合班, 男, 高级农艺师, 研究方向为病虫害综合防治, E-mail: 1505886687@qq.com; 张鹏飞, 男, 博士, 讲师, 研究方向为害虫生物防治, E-mail: zpf821@sina.com

\*\*通讯作者 Author for correspondence: 王进忠, 男, 教授, 研究方向为有害生物综合防治, E-mail: jinzhw9276@163.com

收稿日期 Received: 2024-06-28; 修回日期 Revision received: 2024-10-28; 接受日期 Accepted: 2024-10-28

QIAHEBAN · Hapazi<sup>1\*</sup>, ZHANG Peng-Fei<sup>3\*</sup>, GUO Jia-Luo<sup>2</sup>, DAI Li-Zhen<sup>2</sup>, WANG Jin-Zhong<sup>2\*\*</sup>,  
NAWUERZIBAI · Tuerxun<sup>1</sup>, REN Zheng-Guang<sup>2</sup>, WU Yan-Sheng<sup>3</sup> (1. Agriculture Promotion  
Center of Qinghe county, Aletai 836200, China; 2. Key Laboratory of Urban Agriculture (North  
China), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, College of Bioscience and Resources  
Environment, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China; 3. Hebei Provincial  
Jujube Kernel Utilization Technology Innovation Center, College of Chemical Engineering and  
Biotechnology, Xingtai University, Xingtai 054000, Hebei Province, China)

**Abstract:** In order to clarify the species of a cereal leaf beetle feed on spring wheat in Qinghe County, Xinjiang, China, the external morphology and internal reproductive organ structure of their adults were observed, and the mitochondrial *COI* gene sequence and haplotype were also analyzed. The results showed that the body length of adult was 4.98~5.61 mm and head was dark blue. Antennae was black, 11-segmented and pronotum was orange-red. Elytra was 3.44~3.67 mm in length, covered with 10 striae composed of dense and deep punctures. The coxae, trochanters, tarsi and apices of tibiae are black, femora and tibiae are orange. The intromittent organ (flagellum) in male aedeagus is short, stout, and only slightly curved, with a length of 518.99  $\mu\text{m}$  and a width of 86.29  $\mu\text{m}$ . The ductus spermathecae is approximately 496.95  $\mu\text{m}$  in length, with a heavily sclerotized proximal part, and forms one simple coil. These external morphological features and genital structures are consistent with *Oulema melanopus*. Mitochondrial *COI* sequence analysis showed that the genetic distances between the 11 *O. melanopus* from other countries ranged from 0~0.091, and the phylogeny also indicated that *O. melanopus*, *O. mauroi*, and *O. duftschmidi* were closest affinities. Haplotype analysis showed that it belong to one haplotype alone.

**Key words:** Qinghe county; cereal leaf beetle; external morphology; genitalia; *COI* gene sequence analysis

负泥虫是叶甲科负泥虫亚科昆虫，因其幼虫有将排泄物堆积于体背的习性，故得此名。负泥虫亚科包含22属共约1 500种昆虫，广泛分布于世界各地，其中的禾谷负泥虫属*Oulema*全世界有80余种 (Matsumura *et al.*, 2014)，国内外学者在此领域开展了广泛研究 (Matsumura and Akimoto, 2009; Bukejs and Ferenca, 2010; Xu *et al.*, 2021; Xu and Liang, 2024)。禾谷负泥虫属中的不少种类为重要的经济害虫，在新疆吉木乃县危害严重时可将全株小麦的叶肉吃光，曾导致荷兰谷物减产高达95%，使北美的春小麦和冬小麦分别减产55%和23% (Webster and Smith, 1979; 王永卫, 1983; Daamen and Stol, 1993; Ulrich *et al.*, 2004)。

在禾谷负泥虫属中,将前胸背板以及大部分足呈橙红色的类群归至黑角负泥虫复合体中,包括 *O. duftschmidi*、*O. rufocyanea*、黑角负泥虫、水稻负泥虫等 (Bezděk and Baselga, 2015)。黑角负泥虫复合体物种在外部形态上十分相似,通常需要通过生殖器官解剖、分子鉴定等方法区分 (White, 1993; Bezděk and Baselga, 2015)。该复合体主要发生在包括新疆在内的古北区,其中一些物种存在同域混合发生现象,例如黑角负泥虫与 *O. duftschmidi*,增加了准确鉴定的难度 (Lesage *et al.*, 2007; Bezděk and Baselga, 2015)。国内文献曾报道过新疆黑角负泥虫的危害情况,但尚未通过生殖器官解剖、分子生物学等方法深入鉴定,这些负泥虫是黑角负泥虫,还是黑角负泥虫复合体中的其它相似物种不得而知。

随着分子技术的发展,DNA 条形码技术正越来越多用于生物鉴定中,其中线粒体 DNA 细胞色素氧化酶亚基 I 基因 (Cytochrome Oxidase I Gene, *COI*) 被广泛用于昆虫分类和系统发育上 (Baselga and Fujisawa, 2013; Jalali *et al.*, 2015; 张毅波等, 2015)。鉴于我国新疆小麦负泥虫种类复杂性,还需要从负泥虫生殖器和分子特征上找到鉴别种类的有效证据。因此,我们对采自新疆青河县危害春小麦的一种负泥虫外部形态及生殖器官进行了观察,结合其线粒体 *COI* 基因序列进行分析,建立了分子系统发育树和单倍型网络进化树,更准确鉴别危害春小麦的负泥虫种类,旨在为进一步研究新疆春小麦负泥虫种类生物学和防治技术奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 标本采集

本研究所用小麦负泥虫成虫 201 头,2018 年 5-9 月期间采集于中国新疆青河县阿热勒乡布河坝村小麦田 (46°74'90"N, 90°28'58"E; 海拔 1 250 m)。所有标本均采用扫网法在小麦田中心区域采集。将采集到的活虫用新鲜的小麦叶片饲养于底部铺有 2~3 cm 潮湿沙土的培养盒中,带回实验室后接入健康的小麦苗上,在平均温度为 26°C,光周期为 16 L : 8 D,湿度为 60%的养虫室继续饲养便于形态拍照以及解剖。已死亡的标本装入盛有分析纯无水乙醇的 2 mL 螺口离心管中,每管 1 头,在-20°C 冰箱中保存,用于基因组 DNA 的提取。

### 1.2 外部形态观察

在体视显微镜下对成虫标本各主要部位进行解剖,并在显微镜下对外部形态进行详细观察,测量前胸背板、翅、生殖器等主要部位的长度及宽度并拍照。

### 1.3 生殖器官显微解剖

从采集的标本中随机选取雌雄成虫各 30 头在体视显微镜下进行解剖,外生殖器解剖主要包括雄性阴茎内的插入器和雌性的受精囊导管。将标本腹面朝上放置在凹槽载玻片上,用镊子摘除足和翅,用解剖刀尖从胸腹连接处缓慢插入,轻轻撬开,取出标本完整的腹部,向其滴加 100  $\mu$ L PBS 缓冲液,用镊子缓慢剥离开腹部体壁。从雄性负泥虫腹部取出完整的阴茎,用解剖针固定住阴茎一侧,用镊子从阴茎端口处缓慢伸入夹出插入器,并摘除其他黏连

的组织。雌性受精囊及其导管位于生殖系统中输卵管和交配囊处附近，用解剖针和镊子将其与其他组织剥离取出。解剖所得的插入器转移到干净的载玻片中滴加甘油进行保存，受精囊在装有 100  $\mu$ L PBS 缓冲液的 0.5 mL 的 EP 管中保存。

#### 1.4 DNA 提取、PCR 扩增及测序

所用样本为经过外生殖器解剖并确认种类的雄性负泥虫，共 12 头，采取单头提取。将其胸、腹等放入 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存，其余取头、足放入加有适量液氮的 1.5 mL 离心管中，速冻后用无菌的研磨棒磨成粉末，按照 DNA 提取试剂盒（TIANamp Genomic DNA Kit，天根）步骤提取基因组 DNA。使用超微量紫外可见分光光度计（Bio Teke ND5000）检测提取的 DNA 浓度后置于 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存待用。将浓度合适，质量良好的总 DNA 模板进行 PCR 序列扩增，扩增反应在自动热循环仪（G-Storm PCR）中进行，扩增引物分别为：*COI* LCO1490: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'，*COI* HCO2198: 5'-TAAACTTCAGGGTGCCAAAAAATCA-3'。PCR 反应体系为 25  $\mu$ L，其中 Premix Taq (Ex Taq™Version2.0) 12.5  $\mu$ L，正反向引物各 1.0  $\mu$ L，DNA 模板 1.0  $\mu$ L，双蒸水 9.5  $\mu$ L。PCR 扩增程序为  $94^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min， $94^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s， $50^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s， $72^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min，35 个循环，最后  $72^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min， $4^{\circ}\text{C}$ 保存。取 5  $\mu$ L 的 PCR 产物进行电泳检测，琼脂糖凝胶浓度为 1%，在凝胶成像系统（SN-Lab TRANSILUMINATOR SN-NJ0601）中观察并记录扩增结果。将电泳质检合格的 PCR 产物部送生工生物工程（上海）股份有限公司进行单向测序。

#### 1.5 序列分析

对于测序结果，通过 Chromas 软件查看线粒体 *COI* 基因片段序列波峰，对测序质量进行分析。使用 DNAMAN 7.0 软件对序进行比对和剪切，去除两端测序质量不好的侧翼序列，利用 NCBI 网站的 BLAST 功能 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行同源序列的搜索与相似性分析。在 NCBI 数据库中分别选取来自 8 个国家的 11 个黑角负泥虫 *COI* 基因序列以及本序列，选用 Kimura 2-Parameter 模型计算两两间的遗传距离。用上述 12 条黑角负泥虫 *COI* 基因序列以及数据库中的 17 种禾谷负泥虫属黑角负泥虫复合体物种的线粒体 *COI* 基因片段采用最大似然法 (Maximum Likelihood, ML) 构建系统发育树，以密点龟甲 *Cassida rubiginosa* (登录号: MH322761) 作为外群，分支置信度 Bootstrap 进行 1 000 次重复检验。遗传距离计算以及系统发育树构建均通过 MEGA 7.0 软件完成。使用 DnaSP 软件分析本序列以及数据库选取的其它黑角负泥虫共计 25 条 *COI* 基因序列的单倍型，获得单倍型多态性及核苷酸多样性等信息，之后用 PopART 软件绘制单倍型网络图。物种序列具体信息详见附件。

## 2 结果与分析

### 2.1 成虫外部形态特征

成虫：体长 4.8~5.6 mm，雄较雌略为窄小。头部、触角基部第 1 节及第 2 节为蓝黑色，

有金属光泽。前胸背板为光亮的橙红色，腿节（除基部外）、胫节（除端部外）为橙红色，鞘翅以及腹部为金属蓝黑色。头、触角、足以及体腹面均具黄白色毛（图1）。



图1 采自新疆青河县的负泥虫成虫的背面（A）与腹面（B）

Fig. 1 Dorsal view (A) and ventral view (B) of the adult cereal leaf beetle from Qinghe County, Xinjiang

头：头具刻点，下口式，头部外露，口器向下，额唇基中部隆起呈三角形，刻点粗大，具细密的毛。头部与身体纵轴垂直，复眼突出呈黑色，后头较长稍隆起，头颈部明显，后头区中央有一短纵沟，除中部外，刻点细小（图2-A）。念珠状触角约为体长之半，两触角着生部位较远，在额两侧，共11节，触角第1节膨大为球形，光滑无毛，第2节最短，第5节最长，5~11节为筒形，末节端部收狭（图2-E）。

胸：前胸背板长宽约相等（表1），前胸背板中部平缓隆起，后端1/4处有一浅横凹。前胸背板上分布有细小而不规则的刻点，前缘和后缘区域较稠密，前缘两侧区域有明显的密而深的刻点分布，中部有三列刻点组成的短刻线。前缘收狭，前后缘各有一窄黑带（图2-B），前缘的较后缘的宽。鞘翅呈大盾形，盖及腹端，基节明显宽于前胸，两侧向里收狭，后缘微圆，每侧具10列由密而深刻点组成的刻线，前缘附近有4~7个刻点组成的短刻线（图2-H）。后翅膜质褐色透明，长约4.8 mm，宽约1.8 mm，翅脉清晰，可见一臀室，中脉与径室间有一骨化极弱的径中横脉（图2-F）。

腹：腹部腹面呈金属蓝黑色，腹面刻点密集。前宽后狭可见5节，腹部第1节最宽，2~4节狭窄，第5节略变宽且末端有肛节，腹部顶端中部基节间突至尾端光亮（图2-C）。腹部背面生殖后节中间有近圆形凸起，其中部分凸起中部被浅的纵凹切开，尾部底端毛被短密（图2-D）。

足：基节上有稀疏短毛；腿节粗大，胫节纤细，腿节胫节内侧毛被短而密，外侧几乎无毛；跗节细长，毛被短而密，伸直呈三角形并分为3个跗节，前跗节有两个侧爪（图2-G）。

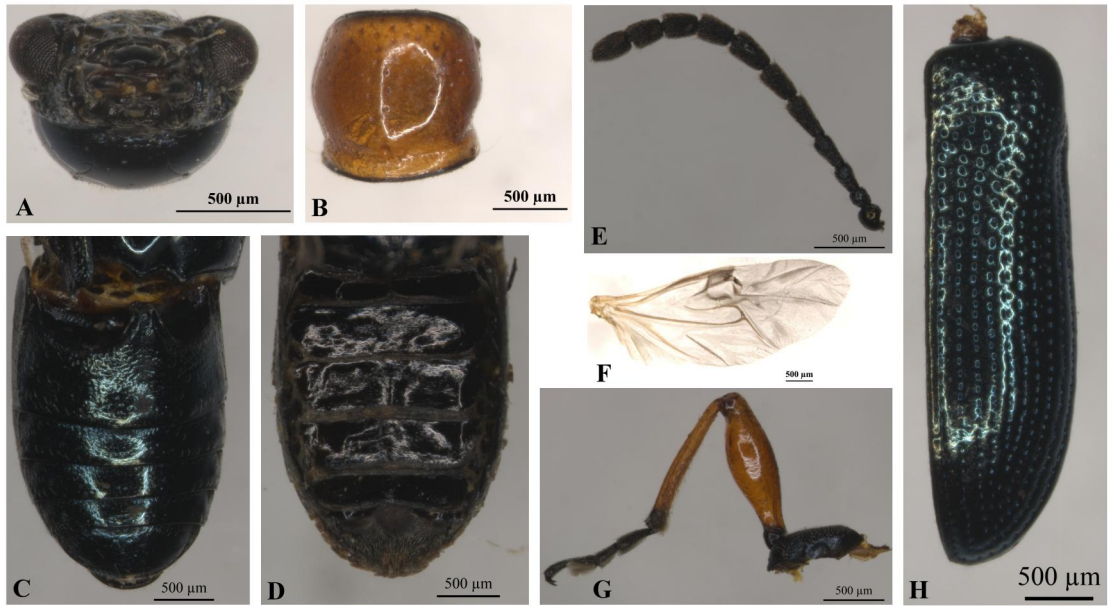


图2 新疆青河县的春小麦负泥虫成虫形态特征

Fig.2 Morphology of the adult cereal leaf beetle from Qinghe County, Xinjiang

注: A, 头; B, 前胸背板; C, 腹部正面; D, 腹部背面; E, 触角; F, 后翅; G, 后足; H, 鞘翅。Note: A, Head; B, Pronotum; C, Abdomen frontal view; D, Abdomen dorsal view; E, Antenna; F, Hind wing; G, Hind leg; H, Elytron.

表1 采自新疆青河县的负泥虫成虫形态特征测量

Table 1 Measurement of the adult cereal leaf beetle from Qinghe County, Xinjiang

| 测量部位 Measuring part         | 平均值 Mean | 标准差 S.D. | 样本数量 Sample size |
|-----------------------------|----------|----------|------------------|
| 雄性 Males                    |          |          |                  |
| 体长 (mm) Body length         | 4.983    | 0.125    | 4                |
| 鞘翅长 (mm) Elytra length      | 3.444    | 0.077    | 4                |
| 鞘翅宽 (mm) Elytra width       | 1.879    | 0.091    | 4                |
| 前胸背板长 (mm) Pronotum length  | 1.128    | 0.076    | 4                |
| 前胸背板宽 (mm) Pronotum width   | 1.116    | 0.545    | 3                |
| 阳基长 (μm) Paramere length    | 546.543  | 42.267   | 2                |
| 阳茎长 (mm) Aedeagus length    | 1.531    | 0.228    | 2                |
| 阳茎角度 (°) Aedeagus angle     | 114.700  | 4.487    | 2                |
| 插入器长 (μm) Flagellum length  | 518.992  | 49.459   | 5                |
| 插入器宽 (μm) Flagellum width   | 86.294   | 11.033   | 4                |
| 中叶长 (μm) Median lobe length | 303.071  | 31.602   | 5                |

|  |         |        |   |
|--|---------|--------|---|
| 中叶宽 (μm) Median lobe width             | 50.724  | 3.128  | 3 |
| 雌性 Females                             |         |        |   |
| 体长 (mm) Body length                    | 5.211   | 0.164  | 8 |
| 鞘翅长 (mm) Elytra length                 | 3.674   | 0.178  | 6 |
| 鞘翅宽 (mm) Elytra width                  | 2.009   | 0.126  | 8 |
| 前胸背板长 (mm) Pronotum length             | 1.202   | 0.072  | 8 |
| 前胸背板宽 (mm) Pronotum width              | 1.220   | 0.012  | 3 |
| 受精囊导管长 (μm) Ductus spermathecae length | 496.947 | 63.026 | 2 |
| 受精囊导管宽 (μm) Ductus spermathecae width  | 28.863  | 2.251  | 2 |

## 2.2 生殖器特征

雄性外生殖器 (图 3-A): 阳茎骨化程度强, 约 115° 弯曲, 端口处骨片不外翻。平时, 插入器储存在阳茎内部 (图 3-D), 交配时, 通过内囊外翻, 将插入器伸出 (图 3-E)。锐利的插入器从基部向顶端逐渐膨大变宽, 在顶端处略收狭, 并且在顶端处有扁平状开口 (图 3-F)。插入器内部明显可见一根类似导管结构从基部沿内侧逐渐延伸至开口处。本负泥虫的插入器短而粗壮, 只有轻微的弯曲, 长度/直径约为 6 (图 3-G)。

雌性外生殖器: 腹产卵瓣呈 T 型, 顶端宽, 向基部逐渐收狭 (图 3-B)。雌性受精囊骨化程度较强, 端部五分之二处回钩状弯曲; 导管呈浅棕色, 中度骨化, 约有一圈导管进行了盘曲折叠, 末端渐粗 (图 3-C)。

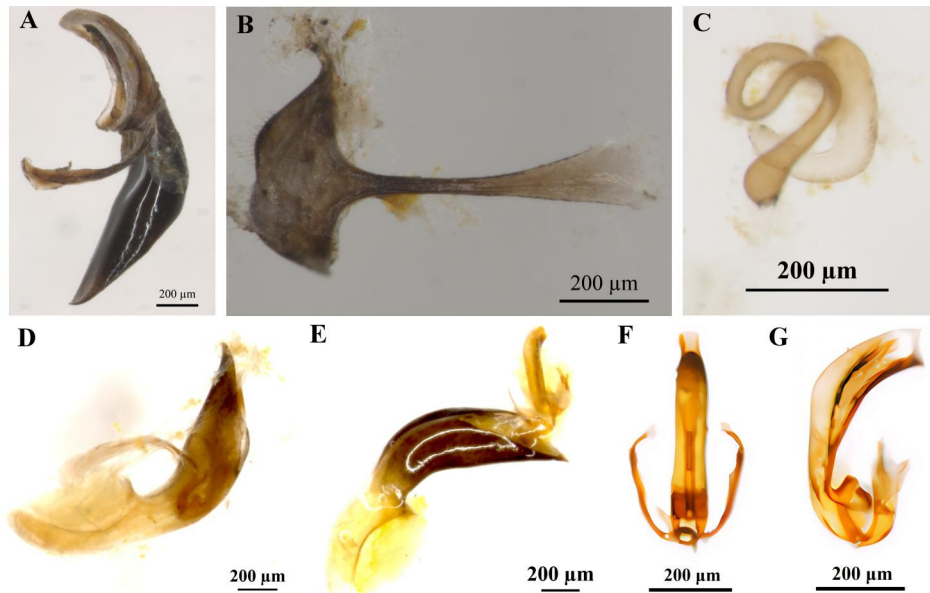


图 3 采自新疆青河县的负泥虫成虫的外生殖器特征

Fig. 3 Genitalia morphology of the adult cereal leaf beetle from Qinghe County, Xinjiang

注: A, 雄性阳茎; B, 腹产卵瓣; C, 受精囊及其导管; D, 插入器在阳茎内; E, 插入器在阳茎外; F, 插入器正面; G, 插入器

侧面。Note: A, Aedeagus; B, Sternite; C, Spermatheca and ductus spermathecae; D, Flagellum in aedeagus; E, Flagellum out of aedeagus; F, Flagellum frontal view; G, Flagellum lateral view.

### 2.3 黑角负泥虫种内遗传距离

包括采自新疆青河县的黑角负泥虫在内的来自 12 个不同地区的黑角负泥虫 *COI* 基因的两两间遗传距离范围为 0~0.091 (表 2)。本黑角负泥虫与摩洛哥标本的遗传差异最小, 种内遗传距离为 0.003 (表 2)。

表 2 黑角负泥虫种群间遗传距离

Table 2 Mean genetic distance among *Oulema melanopus* populations based on *COI*

| 编号及采集地<br>Number and collecting locations               | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1. 中国: 新疆自治区<br>China: Xinjiang Uygur Autonomous Region |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 2. 西班牙: 拉鲁科山脉<br>Spain: Sierra de Larouco               | 0.087 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 3. 西班牙: 中央山脉<br>Spain: Macizo Central                   | 0.091 | 0.003 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 4. 西班牙: 安卡雷斯山脉<br>Spain: Ancares                        | 0.089 | 0.002 | 0.002 |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 5. 芬兰: 阿兰迪亚<br>Finland: Alandia                         | 0.087 | 0.012 | 0.012 | 0.010 |       |       |       |       |       |       |       |
| 6. 德国: 巴伐利亚<br>Germany: Bavaria                         | 0.041 | 0.080 | 0.080 | 0.082 | 0.076 |       |       |       |       |       |       |
| 7. 德国: 莱茵兰普法尔茨<br>Germany: Rhineland Palatinate         | 0.039 | 0.078 | 0.078 | 0.080 | 0.075 | 0.002 |       |       |       |       |       |
| 8. 捷克共和国: 杜夫拉维什<br>Czech Republic: Douvřavice           | 0.037 | 0.077 | 0.077 | 0.078 | 0.077 | 0.003 | 0.002 |       |       |       |       |
| 9. 摩洛哥: 伊夫兰<br>Morocco: Ifrane                          | 0.003 | 0.087 | 0.091 | 0.089 | 0.087 | 0.043 | 0.041 | 0.039 |       |       |       |
| 10. 法国: 上普罗旺斯<br>France: Alpes de Haute provence        | 0.037 | 0.077 | 0.077 | 0.078 | 0.073 | 0.003 | 0.002 | 0.003 | 0.039 |       |       |
| 11. 捷克共和国: 布拉格<br>Czech Republic: Praha                 | 0.039 | 0.078 | 0.078 | 0.080 | 0.075 | 0.002 | 0.000 | 0.002 | 0.041 | 0.002 |       |
| 12. 加拿大: 安大略<br>Canada: Ontario                         | 0.039 | 0.078 | 0.078 | 0.080 | 0.075 | 0.002 | 0.000 | 0.002 | 0.041 | 0.002 | 0.000 |

### 2.4 系统发育分析

系统发育树可以分为两大聚类 (图 4), 一类是以红色前胸背板为特征的 5 个黑角负泥虫复合体近缘种, 另一类是同一属但来自不同复合体的 *O. gallaeciana*、*O. hoffmannseggii*、*O. obscura*。从新疆青河县采集的负泥虫的 *COI* 基因序列 (HJ) 位于黑角负泥虫复合体的聚类中, 但未恢复为单系, 与 *O. duftschmidi*、*O. mauroi* 未显示出明显的分离, 不易区分。发育树的外群为密点龟甲 *Cassida rubiginosa*。



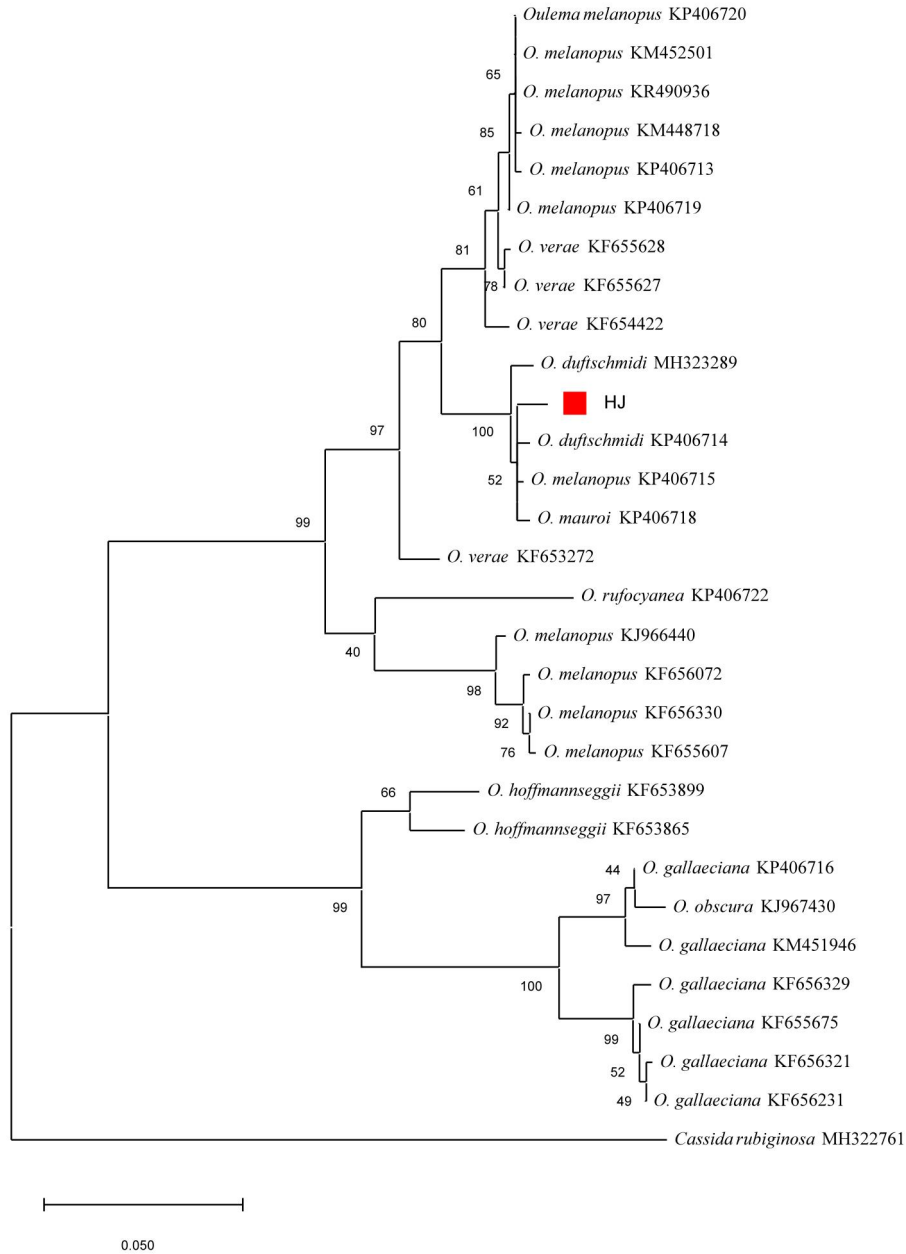


图 4 禾谷负泥虫属 *Oulema* 物种基于 *CO I* 基因的 ML 系统发育树

Fig. 4 Maximum likelihood analysis of *CO I* gene sequences among *Oulema* species

## 2.5 单倍型分析

对来自 9 个国家的 25 个黑角负泥虫线粒体 *COI* 基因序列（序列信息详见附件）进行分析，共发现 22 个单倍型，分别命名为 H1-H22。多态性位点共有 160 个，占分析位点总数的 24.32%。单倍型多态性 (Hd) 以及核苷酸多样性 ( $\pi$ ) 值分别为 0.98 和 0.05。只有 H7 为共享单倍型，由来自德国、法国、捷克和加拿大的 4 条序列共享，其余 21 个均为特殊单倍型。来自我国新疆青河县的这条序列属于单倍型 H1。基于这 25 条黑角负泥虫线粒体 *COI* 基因序列构建的单倍型网络图（图 5）显示，单倍型 H1-H4 及 H10 和 H12 分到了一个类群，本序列以及来自意大利的 3 条序列和分别来自芬兰和摩洛哥的 2 条序列属于该类群；H9 和 H11

以及 H17-H19 分到了一个类群。H5-H8、H13-H16 以及 H20 和 H22 分到了一个类群，在该类群中，以单倍型 H7 为核心分别演化出其他 9 个单倍型。单倍型 H21 单独分到了一个类群。

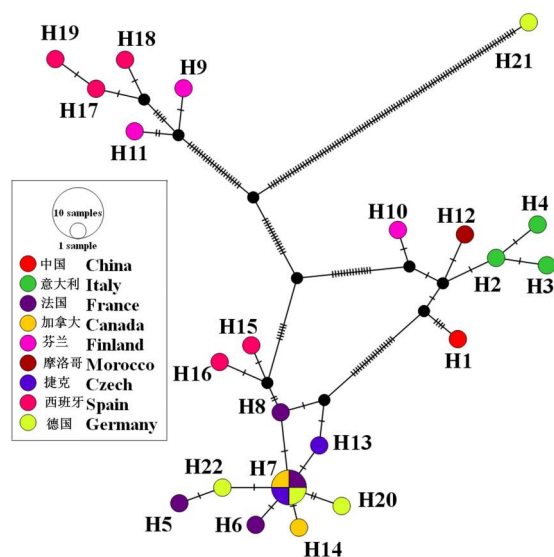


图 5 基于黑角负泥虫 *COI* 基因序列构建的单倍型网络图

Fig. 5 Haplotype network map constructed based on *COI* gene sequences of *Oulema melanopus* species.

注：短横线的数量表示 2 种单倍型之间突变碱基数量。Note: The number of short horizontal lines indicated the number of mutated bases between two haplotypes.

### 3 结论与讨论

对采自新疆省青河县的小麦负泥虫 30 头成虫标本进行外部形态与生殖器官解剖观察，和线粒体 *COI* 基因序列测定分析表明，中国新疆青河县为害春小麦的负泥虫为黑角负泥虫 *O. melanopus*，隶属于鞘翅目、叶甲科，负泥虫亚科、禾谷负泥虫属。

根据观察到的外部形态特征，尤其是橙红色的前胸背板和足，判断采自新疆青河县的负泥虫属于禾谷负泥虫属黑角负泥虫复合体中的物种。由于该负泥虫平均体长和鞘翅长与黑角负泥虫复合体中的黑角负泥虫和 *O. duftschmidi* 非常接近，明显长于同复合体的其他物种，因此，从外部形态可将本负泥虫鉴定为黑角负泥虫或 *O. duftschmidi* (Bezděk and Baselga, 2015)。黑角负泥虫与 *O. duftschmidi* 内生殖器官存在较明显的区别，尤其是作为阴茎内的精子输送结构的插入器，在黑角负泥虫复合体种间具有明显差异，并且雌性受精囊内导管的形状以及盘绕圈数也有很大的变化 (Bezděk and Baselga, 2015)。显微观察发现来自新疆青河县的负泥虫阴茎内插入器粗短，只有轻微的弯曲，雌性受精囊导管盘曲折叠仅约 1 圈，与黑角负泥虫生殖器特征符合，而与文献记载 *O. duftschmidi* 的阴茎内插入器细长，接近半圆形，雌虫受精囊导管盘绕 3 圈不一致 (Bukejs and Ferenca, 2010; Schmitt and Uhl, 2017)。文献报道，*O. duftschmidi* 与黑角负泥虫在许多国家（至少在欧洲）多为混合出现 (Lesage *et al.*, 2007; Bezděk and Baselga, 2015)，是当地谷物的重要害虫。本研究查明了新疆青河县为害

春小麦的负泥虫为黑角负泥虫,为进一步研究新疆春小麦负泥虫种类生物学和防治技术奠定基础。

在新疆北部及伊犁河谷等地都有黑角负泥虫发生的报道(胡红英, 2012), 这些地区是否存在同域发生现象尚待进一步研究。此外, 我国的河北、河南、山东等小麦产区尚未报道过黑角负泥虫的发生, 这些区域是否适合其生存以及新疆的黑角负泥虫是否有可能入侵至这些区域不得而知。刘孝贤等人通过生物适生性软件预测, 黑角负泥虫在我国的适生区位于25°N~48°N之间, 在我国北方主要是位于平原、盆地等水热条件较好的地区, 这些区域正是小麦产区(刘孝贤等, 2020)。黑角负泥虫的自然扩散能力较弱, 远距离传播主要依靠成虫隐藏在谷物秸秆、杂草中随人类活动而发生(Hyans and Gage, 1981)。我国边疆与内地间有荒漠及高山形成的阻隔, 在过去两区域之间也并无频繁的商品贸易, 致使黑角负泥虫扩散范围有限。然而, 近年来东西部之间贸易交流不断增加, 大大增加了黑角负泥虫入侵内地的可能性。

线粒体 DNA 片段 *COI* 序列是否反映物种界限和地理范围, 取决于它们与物种形态结构是否相匹配(Baselga and Fujisawa, 2013)。早先研究认为, *COI* 基因序列变异与现有分类和已知组群的地理分布基本一致(Pons *et al.*, 2006; Monaghan *et al.*, 2009), 然而, 也有资料报道 20%以上物种表现出一定程度的不一致性(Funk and Omland, 2003)。对来自新疆青河县的禾谷负泥虫研究表明, 从形态学上可明确鉴别的黑角负泥虫, 但从 *COI* 基因序列上, 却难以与黑角负泥虫复合体中的 *O. duftschmidi*、*O. mauroi* 分开。同样在欧洲黑角负泥虫复合种群标本的 *COI* 基因序列, 也未能将该复合体中几个明确的负泥虫物种区分开(Bezděk and Baselga, 2015)。此外, 在叶甲科长跗跳甲属 *Longitarsus* 和短柱叶甲属 *Pachybrachis*、灰蝶科 *Rhanna* 属以及球腹蛛科球蛛属 *Theridion* 的物种中均观察到形态界限分明的物种之间缺乏线粒体序列上差异的现象(Baselga and Fujisawa, 2013; Prieto *et al.*, 2019; Marc *et al.*, 2020)。一个可能原因是基因流动对线粒体 mtDNA 的影响相对核 DNA 大, 存在一定程度的不稳定性, 导致种内线粒体 DNA 序列变异速率甚至高于种间变异速率(Sota and Vogler, 2001; Sota and Sasabe, 2006)。同时也说明了单一的方法或数据源难以准确反映生物在数千年进化过程中产生的变化(Marc *et al.*, 2020)。由此可见, 了解线粒体 mtDNA 与核 DNA 或形态学的一致性也是十分重要的。

致谢: 感谢农业应用新技术北京市重点实验室的杨瑞、张卿老师和农业农村部华北都市农业重点实验室杨爱珍老师在显微照相上给予的帮助; 感谢中国科学院动物研究所梁宏斌研究员在负泥虫鉴定上给予的指导; 感谢北京登海种业公司吕楠博士和意大利种子协会 Franco Brazzabeni 博士以及北京农学院动科学院郭凯军博士文献资料上大力帮助。

### 参考文献 (References)

- Armstrong KF, Ball SL. DNA barcodes for biosecurity: Invasive species identification [J] *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 2005, 1462 (360): 1813-1823.
- Baselga A, Fujisawa T, Crampton-Platt A, *et al.* Whole-community DNA barcoding reveals a spatio-temporal continuum of biodiversity

- at species and genetic levels [J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 1892.
- Bezděk J, Baselga A. Revision of western palaeartic species of the *Oulema melanopus* group, with description of two new species from Europe (Coleoptera: Chrysomelidae: Criocerinae) [J]. *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae*, 2015, 55 (1): 273-304.
- Bukejs A, Ferenca R. The first record of *Oulema duftschmidti* (Redtenbacher, 1874) (Coleoptera: Chrysomelidae) in the *Lithuanian fauna* [J]. *Acta Zoologica Lituanica*, 2010, 20 (4): 229-231.
- Daamen RA, Stol W. Surveys of cereal diseases and pests in the Netherlands. 6. Occurrence of insect pests in winter wheat [J]. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 1993, 99 (3): 51-56.
- Funk DJ, Omland KE. Species-level paraphily and polyphyly: Frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA [J]. *Annual Review of Ecology Evolution & Systematics*, 2003, 34 (1): 397-423.
- Hu HY. Colored Pictorial Handbook of Insects in Xinjiang [M]. Xinjiang: Xinjiang University Press, 2012: 148. [胡红英. 新疆昆虫原色图鉴 [M]. 新疆: 新疆大学出版社, 2012: 148]
- Hyanes D, Gage S. The cereal leaf beetle in North America [J]. *Annual Review of Entomology*, 1981, 26 (1): 259-287.
- Jalali SK, Rakshit O, Venkatesan T. DNA barcoding for identification of agriculturally important insects. In: Chakravarthy A, eds. *New Horizons in Insect Science: Towards Sustainable Pest Management* [C]. New Delhi: Springer Press, 2015: 13-23.
- Lesage L, Dobesberger EJ, Majka CG. Introduced leaf beetles of the maritime provinces, 2: The cereal leaf beetle *Oulema melanopus* (Linnaeus) (Coleoptera: Chrysomelidae) [J]. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 2007, 109 (2): 286-294.
- Liu XX, Li L, Wang T, et al. Predicting the potential geographical distribution of *Oulema melanopus* (Coleoptera: Chrysomelidae) in China based on CLIMEX [J]. *Journal of Biosafety*, 2020, 29 (2): 106-114. [刘孝贤, 李兰, 王婷, 等. 基于CLIMEX预测黑角负泥虫在中国的潜在地理分布 [J]. *生物安全学报*, 2020, 29 (2): 106-114]
- Marc D, Luís C, Crespo A, et al. Mitochondrial discordance in closely related *Theridion* spiders (Araneae, Theridiidae), with description of a new species of the *T. melanurum* group [J]. *Zoosystematics and Evolution*, 2020, 96 (1): 159-173.
- Matsumura Y, Akimoto SI. Mating behavior and genital damage during copulation in the leaf beetle *Lema coronata* (Chrysomelidae: Criocerinae) [J]. *Journal of Entomological Science*, 2009, 12 (2): 215-217.
- Matsumura Y, Yao I, Beutel RG, et al. Molecular phylogeny of the leaf beetle subfamily Criocerinae (Coleoptera: Chrysomelidae) and the correlated evolution of reproductive organs [J]. *Arthropod Systematics and Phylogeny*, 2014, 72 (2): 95-110.
- Monaghan MT, Wild R, Elliot M, et al. Accelerated species inventory on Madagascar using calescent-based models of species delineation [J]. *Systematic Biology*, 2009, 58 (3): 298-311.
- Pons J, Barraclough TG, Gomez-Zurita J, et al. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects [J]. *Systematic Biology*, 2006, 55 (4): 595-609.
- Prieto C, Nuez R, Hausmann A. Molecular species delimitation in the genus *Rhamma* (Johnson, 1992) (Lepidoptera, Lycaenidae, Theclinae) [J]. *Mitochondrial DNA*, 2019, 30 (1): 101-117.
- Schmitt M, Uhl G. *Oulema septentrionis* and *O. erichsonii* are neither conspecific nor melanic variants of *O. melanopus* as assessed by micro CT analysis of their lectotypes (Insecta, Coleoptera, Chrysomelidae, Criocerinae) [J]. *ZooKeys*, 2017, 720: 121-130.
- Sota T, Sasabe M. Utility of nuclear allele networks for the analysis of closely related species in the genus *Carabus*, subgenus *Ohomopterus* [J]. *Systematic Biology*, 2006, 55 (2): 329-344.
- Sota T, Vogler AP. Incongruence of mitochondrial and nuclear gene trees in the carabid beetles *Ohomopterus* [J]. *Systematic Biology*, 2001, 50 (1): 39-59.
- Ulrich W, Czarniecki A, Kruszynski T. Occurrence of pest species of the genus *Oulema* (Coleoptera: Chrysomelidae) in cereal fields in Northern Poland [J]. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 2004, 7: 1-8.
- Wang YW. A preliminary survey of the cereal leaf beetle, *Oulema oryzae* injuring small in Xinjiang [J]. *Journal of Plant Protection*, 1983, 3: 213-214. [王永卫. 水稻负泥虫在新疆危害三麦情况的初报 [J]. *植物保护学报*, 1983, 10 (3): 213-214]
- Webster JA, Smith HD. Yield losses and host selection of cereal leaf beetles in resistant and susceptible spring barley [J]. *Crop Science*, 1979, 19 (6): 901-904.
- White RE. A revision of the subfamily Criocerinae (Chrysomelidae) of north America north of Mexico [J]. *Technical Bulletin United States Department of Agriculture*, 1993, 18 (5): 1-158.
- Xu Y, Liang HB. Three new species and five new records within the genus *Liliocercis* (Coleoptera, Chrysomelidae, Criocerinae) from China [J]. *ZooKeys*, 2024, 1189: 55-81.
- Xu Y, Xiong Y, Liang HB. A review of the *neptis* species group of the genus *Liliocercis* (Coleoptera: Chrysomelidae: Criocerinae) [J]. *Zoological Systematics*, 2021, 46 (4): 300-316.
- Zhang YB, Yang NW, Zhang GF, et al. Identification of naturally occurring *Eretmocerus* parasitoids by *COI* sequence analysis and crossing test [J]. *Journal of Environmental Entomology*. 2015, 37 (2): 281-292. [张毅波, 杨念婉, 张桂芬, 等. 利用 *COI* 基因序列和杂交实验分析鉴定浆角蚜小蜂属的本地种群 [J]. *环境昆虫学报*, 2015, 37 (2): 281-292]