

# 基于 COI、18S rDNA 和 28S rDNA 基因序列的 香樟齿喙象系统发育地位分析

张丛丛<sup>1</sup>, 顾天滋<sup>1</sup>, 苏鹏<sup>2</sup>, 樊斌琦<sup>3</sup>, 王焱<sup>3</sup>, 郝德君<sup>1\*</sup>

(1. 南京林业大学南方现代林业协同创新中心, 南京林业大学林学院, 江苏 南京 210037;

2. 上海市松江区林业站, 上海 201600; 3. 上海市林业总站, 上海 200072)

**摘要:** [目的] 香樟齿喙象是近年来发现的一种危害香樟的单食性蛀干害虫, 为探索其系统发育地位和遗传进化关系, 本研究分别扩增香樟齿喙象的 mtDNA COI、18S rDNA V4、V7 区和 28S rDNA D2 区序列。[方法] 采用邻接法 (neighbour-joining) 和极大似然法 (maximum likelihood) 构建不同序列的系统发育树, 分析香樟齿喙象与象甲科 Curculionidae 其它种类同源序列的碱基组成及系统进化特点, 从分子水平探讨香樟齿喙象的分类地位。[结果] 表明: COI 与 rDNA 均显示香樟齿喙象与同科同族的魔喙象亚科 Molytinae、树皮象族 Hylobiini 种类遗传距离最为相近, 虽然无法比对到同属下的种类, 但支持香樟齿喙象归为魔喙象亚科树皮象族的观点。[结论] 通过比较发现, 28S rDNA 序列分析结果印证了香樟齿喙象目前的分类地位, 本研究为香樟齿喙象在分子水平上的鉴定提供了理论依据。

**关键词:** 香樟齿喙象; 线粒体 COI 基因; 核糖体 DNA; 系统发育树

中图分类号: S718.46

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2018)03-0078-10

## Identification and Phylogenetic Position of *Pagiophloeus tsushmanus* Based on COI and rDNA Sequences

ZHANG Cong-cong<sup>1</sup>, GU Tian-zhi<sup>1</sup>, SU Peng<sup>2</sup>, FAN Bin-qi<sup>3</sup>, WANG Yan<sup>3</sup>, HAO De-jun<sup>1</sup>

(1. Co-Innovation Center for the Sustainable Forestry in Southern China, College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037,

Jiangsu, China; 2. Forest Station of Songjiang District, Shanghai 201600, China; 3. Forest Station of Shanghai, Shanghai 200072, China)

**Abstract:** [Objective] To analyze the phylogenetic position and genetic evolution of *Pagiophloeus tsushmanus*. [Method] Four DNA sequence fragments: cytochrome oxidase subunit I (COI) gene of mitochondrial DNA (mtDNA), V4 and V7 region of 18S ribosomal DNA (18S rDNA) and D2 region of 28S ribosomal DNA (28S rDNA) were amplified. Maximum likelihood (ML) and neighbor joining (NJ) methods were used to build up phylogenetic trees of *P. tsushmanus* and related species in Curculionidae, so as to study the classification status of *P. tsushmanus*. [Result] Analysis on COI and rDNA suggested that *P. tsushmanus* belongs to Hylobiini of Molytinae. [Conclusion] According to the analysis, the results of 28S rDNA support the morphological classification of *P. tsushmanus*.

**Keywords:** *Pagiophloeus tsushmanus*; mtDNA COI; ribosomal DNA; phylogenetic tree

象甲科 Curculionidae 在鞘翅目昆虫中种间变异程度极其复杂, 不同地区受到环境、植被等因子的影

响往往出现与各区系生态环境相适应的象虫种类<sup>[1]</sup>。象甲科昆虫均为植食性害虫, 幼虫和成虫对

收稿日期: 2017-04-05

基金项目: 上海市松江区科技攻关项目(14SJGNY11); 上海市绿化和市容管理局攻关项目(G161206)

作者简介: 张丛丛, 硕士生。主要研究方向: 森林昆虫学

\* 通讯作者: 郝德君, 教授。主要研究方向: 森林昆虫学, 昆虫化学生态, 昆虫分类学。E-mail: djhao@njfu.edu.cn

寄主植物的根、茎、叶、花、果、种子、幼芽和嫩梢等部位均有不同程度的危害,其中幼虫阶段长期蛀食植物内部,破坏输导组织,危害最为严重<sup>[2]</sup>。香樟齿喙象(*Pagiophloeus tsushimanus*)隶属鞘翅目 Coleoptera 象甲科 Curculionidae 魔喙象亚科 Molytinae 树皮象族 Hylobiini 齿喙象属 *Pagiophloeus*<sup>[3-4]</sup>,是一种重要的钻蛀性害虫。分布于我国(上海和福建)和日本,2014年首次报道其在中国上海危害香樟(*Cinnamomum camphora*(L.) Presl),且被鉴定为中国新记录种<sup>[3]</sup>。以幼虫钻蛀香樟主干和侧枝的韧皮部和木质部,常常导致树势衰弱,生长不良,易受其他病虫害的侵害<sup>[5]</sup>。

随着分子系统学研究的逐步深入,通过分子生物学对物种分类地位进行鉴定的分析技术日趋成熟。分子系统学的研究主要是依据 DNA 和蛋白质序列,其主要原理是通过分子遗传标记,将各物种进行系统分析,以此探讨各物种在遗传进化中的分类地位。常用的分子标记主要有进化速率快,具有母系遗传,几乎不发生重组的核外线粒体 DNA 中细胞色素氧化酶第亚基(Cytochrome oxidase subunit I)<sup>[6-7]</sup>,以及进化速率较慢,各区保守性不同的核内核糖体 DNA(Ribosomal DNA, rDNA)<sup>[8]</sup>。但是无论是以线粒体基因还是核基因作为标记,都有各自的优缺点,不能全面反映物种间的真实进化关系,因此联合基因的应用已成为研究昆虫分子系统发育学领域的一种发展趋势。COI 基因与 rDNA 基因的进化速率不同,适用于不同的分类阶元,因此可以相互弥补和验证,从而更全面、准确的反映系统发育关系。Malvadi 利用 18S rDNA 构建了象虫总科 Curculionidae 的系统发育树,并提出 18S rDNA 的部分序列适用于科级以上阶元的分类<sup>[9-11]</sup>。黄华平等根据国内外研究结果对常用的几种分子标记的特点、适用范围进行了总结<sup>[12]</sup>。张健等分别用线粒体 16S rDNA 和核糖体 28S rDNA 为分子标记对天牛亚科 Cerambycinae 间系统发育关系做了系统研究,分析了天牛亚科 Cerambycinae 的进化关系<sup>[13-14]</sup>。近几年,国内利用分子生物学对部分象甲科昆虫的系统进化分析也取得了一定成果,王志良和张润志曾结合已有研究,通过传统形态学结合分子生物学方法,综合比较小蠹亚科 Scolytinae 分类地位,认同小蠹亚科是象甲科的一个亚科的结论<sup>[15]</sup>。栾秉刚等通过对 COI 基因标记分析萧氏松茎象(*Hylobitelus xiaoi*)的分类地位,为萧氏松茎象的鉴定提供了可靠的分

子生物学依据<sup>[16]</sup>。

本研究通过对香樟齿喙象成虫的线粒体 COI 基因和核糖体 18S rDNA、28S rDNA 进行测序分析,与 GenBank 已有的象甲科昆虫的相关基因序列比对,探讨研究香樟齿喙象在象甲总科中的系统进化关系,为分子鉴定、生物学、生态学及防治技术等研究提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试昆虫及试剂

供试昆虫:香樟齿喙象(*P. tsushimanus*)的成虫采自上海市松江区泖冈镇香樟(*C. camphora*(L.) Presl)人工林,将采集的成虫置于 100% 的乙醇溶液中,带回室内于 -20℃ 冰箱保存备用。

主要试剂:DNA 提取试剂购自生工生物工程(上海)股份有限公司, DNA 聚合酶、琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司,基因克隆相关试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司。

### 1.2 基因组 DNA 提取

采用磁珠法提取基因组 DNA:取虫体约 30 g,用双蒸水冲洗去除残留乙醇后,将组织进行研磨,加入适量的裂解液及蛋白酶 K,随后根据基因组提取试剂盒(上海生工)进行操作,利用 Nano Drop 1 000 紫外分光光度计(Thermo Scientific, America)和琼脂糖凝胶电泳对所抽提出的总 DNA 进行浓度和纯度(OD<sub>260/280</sub>)检测,检测合格的 DNA 置于 -20℃ 保存备用。

### 1.3 PCR 扩增和测序

1.3.1 引物设计 COI 引物参照 Loxdale 等<sup>[17]</sup>合成: C1-J-1718 (5'-GGAGATTTGGAAATTGATTGT-TCC-3') 和 C1-N-2191 (5'-CCC GG TAAAATTA-AAATATAAACTTC-3'); 18S rDNA V4 区和 V7 区的扩增引物片段参照 Raupach 等<sup>[18]</sup>: CV4F (5'-TGGT-GCCAGCAGCCGCGGTAA-3') 和 CV4R (5'-CCTCTA-ACGTCGCAATACGAATGCC-3'), CV7F (5'-CTTA-AAGGAATTGACGGAGGGCACCACC-3') 和 CV7R (5'-GATTCCTTCAGTGTAGCGCGGTG-3') 及 28S rDNA D2 区基因序列的引物参照 Gillespie 等<sup>[19]</sup>: D2F (5'-GGACCCGTCTTGAACAC-3') 和 D2R (5'-GCATAGTTCACCATCTTTC-3')。

1.3.2 PCR 扩增及测序 PCR 反应体系含 10 × PCR Buffer 5.0 μL、dNTP 4.0 μL、DNA 模板 1.0

$\mu\text{L}$ 、Taq 酶  $0.5 \mu\text{L}$ 、上下游引物各  $1 \mu\text{L}$ 、无菌水补至  $50 \mu\text{L}$ 。PCR 条件为:  $95^\circ\text{C}$  预变性  $5 \text{ min}$ ,  $94^\circ\text{C}$  变性  $30 \text{ s}$ ,  $50^\circ\text{C}$  退火  $1 \text{ min}$ ,  $72^\circ\text{C}$  延伸  $90 \text{ s}$ , 循环  $35$  次,  $72^\circ\text{C}$  充分延伸  $7 \text{ min}$ 。将 PCR 扩增产物于 2% 的琼脂糖凝胶电泳上检测并回收, 回收产物与 pEASY<sup>®</sup>-T1 载体连接, 转化大肠杆菌 Trans1-T1, 涂布过夜培养后筛选出阳性克隆, 送至上海杰李生物技术有限公司测序。

#### 1.4 序列处理及分析

利用软件 MEGA 5.1<sup>[20]</sup> 和 SeqMan<sup>[21]</sup>, 进行序列的拼接与比对, 确保获得目的基因片段。拼接好

的序列提交 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行同源性比对, 防止外源基因的污染, 并获得近缘种的 COI 和 rDNA 基因序列(表 1)。并选取鞘翅目中与象甲科亲缘关系较为接近的种作为外种群, 以避免构建进化树时产生长枝吸引现象<sup>[22]</sup>。将所得序列载入软件 Clustal X 1.83<sup>[23]</sup> 进行比对, 比对结果导入 MEGA 5.1<sup>[20]</sup>, 计算序列间的遗传距离并进行碱基替换饱和度分析。分别采用最大似然法(maximum likelihood, ML) 和邻接法(neighbor joining, NJ) 构建系统发育树。

表 1 用于进化树构建的 COI、18S rDNA (V4 及 V7)、28S rDNA (D2) 序列基因登录号

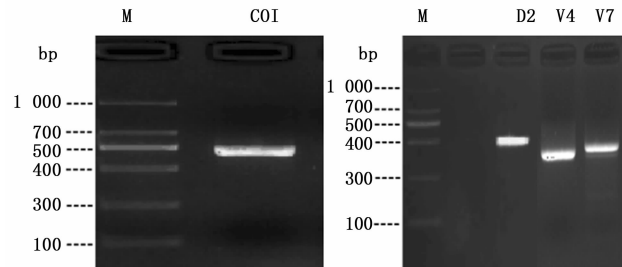
Table 1 GenBank accession numbers of COI, 18S rDNA (V4 and V7), 28S rDNA (D2) sequences used in phylogenetic tree

科/亚科 family/subfamily	COI 种 species	登录号 accession number	科/亚科 family/subfamily	18S rDNA V4 种 species	登录号 accession number
Cryptorhynchinae	<i>Kykliocalles provincialis</i>	GU987894.1	Curculioninae	<i>Eusomus ovulum</i>	JN619090.1
Magdalinae	<i>Magdalis ruficornis</i>	KJ962562.1	Curculioninae	<i>Acalles ptinoides</i>	AJ850002.1
Ceutorhynchinae	<i>Ceutorhynchus gallorhenanus</i>	DQ058700.1	Curculioninae	<i>Cleopomiarus meridionalis</i>	JX091170.1
Entiminae	<i>Naupactus ambiguus</i>	AY790879.1	Molytinae	<i>Calvertius tuberosus</i>	AF389070.1
Baridinae	<i>Baris picicornis</i>	KM439312.1	Entiminae	<i>Polydrusus sericeus</i>	AF250086.2
Ceutorhynchinae	<i>Ceutorhynchus rapae</i>	DQ058702.1	Molytinae	<i>Tranes lyterioides</i>	KP419321.1
Ceutorhynchinae	<i>Ceutorhynchus erysimi</i>	DQ058698.1	Molytinae	<i>Sympiezoscelus spencei</i>	KP419304.1
Scolytinae	<i>Xylocleptes adeniae</i>	JX263819.1	Scolytinae	<i>Ips lecontei</i>	KJ531085.1
Entiminae	<i>Galapaganus ashlocki</i>	AF211488.1	Scolytinae	<i>Ips pini</i>	KJ531081.1
Baridinae	<i>Brachypera zoilus</i>	KM447815.1	Scolytinae	<i>Ips typographus</i>	KJ531078.1
Hyperinae	<i>Hypera postica</i>	KU188400.1	Cyclominae	<i>Talaurinus subvittatus</i>	AF389054.1
Hyperinae	<i>Hypera diversipunctata</i>	KR487166.1	Scolytinae	<i>Pityokteines minutus</i>	AF308342.1
Molytinae	<i>Hylobitelus xiaoi</i>	KC476444.1	Curculioninae	<i>Rhinusa bipustulata</i>	JX091146.1
Molytinae	<i>Hylobius abietis</i>	EF450122.1	Curculioninae	<i>Rhinusa neta</i>	JX091122.1
Cerambycidae	<i>Desisa variabilis</i>	FJ559008.1	Entiminae	<i>Barypeithes pellucidus</i>	JN619047.1
Scolytinae	<i>Hylesinus varius</i>	KC845462.1	Lamiinae	<i>Anoplophora glabripennis</i>	KF142077.1
Lepturinae	<i>Nanostrangalia chujoi</i>	FJ559029.1	Lamiinae	<i>Anoplophora chinensis</i>	KF141949.1
Entiminae	<i>Naupactus dissimulator</i>	JX440497.1	Lamiinae	<i>Monochamus alternatus</i>	KF141961.1
Ceutorhynchinae	<i>Ceutorhynchus fallax</i>	DQ058699.1	Entiminae	<i>Pachylobius picivorus</i>	AF250103.2
科/亚科 family/subfamily	18S rDNA V7 种 species	登录号 accession number	科/亚科 family/subfamily	28S rDNA D2 种 species	登录号 accession number
Cryptorhynchinae	<i>Acalles ptinoides</i>	AJ850002.1	Entiminae	<i>Trichalophus caudiculatus</i>	KU748546.1
Hyperinae	<i>Hypera postica</i>	JX239438.1	Curculionidae	<i>Aesiotes notabilis</i>	FJ867654.1
Entiminae	<i>Sciaphilus asperatus</i>	JN619105.1	Scolytinae	<i>Ambrosiodmus aegir</i>	FJ867655.1
Magdalinae	<i>Magdalis barbicornis</i>	JN619019.1	Brentidae	<i>Aporhina australis</i>	FJ867657.1
Cryptorhynchinae	<i>Bepharus ellipticus</i>	FJ867740.1	Cossoninae	<i>Araucarietius viridans</i>	FJ867658.1
Entiminae	<i>Meira crassicornis</i>	DQ337113.1	Curculioninae	<i>Curculio niveopictus</i>	FJ867675.1
Chrysomelidae	<i>Lilioceris merdigera</i>	AJ841445.1	Curculioninae	<i>Eisingius chusquae</i>	FJ867680.1
Curculioninae	<i>Gymnetron antirhini</i>	AJ850004.1	Curculionidae	<i>Gymnetron tetrum</i>	FJ867684.1
Entiminae	<i>Sitona striatellus</i>	AJ849997.1	Curculioninae	<i>Myrmex floridanus</i>	FJ867694.1
Curculionidae	<i>Chrysolopus spectabilis</i>	FJ867745.1	Entiminae	<i>Sitona hispidulus</i>	FJ867710.1
Chrysomelidae	<i>Aulacoscelis appendiculata</i>	AJ841524.1	Molytinae	<i>Hylobius piceus</i>	HQ883576.1
Curculioninae	<i>Curculio glandium</i>	KP419065.1	Molytinae	<i>Hylobius abietis</i>	JN544547.1
Ceutorhynchinae	<i>Ceutorhynchus scrobicollis</i>	JX091171.1	Curculioninae	<i>Curculio lateritius</i>	AB573462.1
Curculionidae	<i>Philopedon plagiatum</i>	JN619148.1	Scolytinae	<i>Pityokteines curvidens</i>	KJ531136.1
Cossoninae	<i>Araucarius minor</i>	AF308304.1	Brachyceridae	<i>Notaris acridulus</i>	KP419545.1
Curculionidae	<i>Hypera nigrirostris</i>	AJ850005.1	Molytinae	<i>Tranes lyterioides</i>	KP419676.1
Lamiinae	<i>Anoplophora chinensis</i>	KF142013.1	Lamiinae	<i>Anoplophora glabripennis</i>	KF142077.1
Lamiinae	<i>Anoplophora glabripennis</i>	KF142012.1	Lamiinae	<i>Anoplophora chinensis</i>	KF142078.1
Lamiinae	<i>Monochamus alternatus</i>	KF142025.1	Lamiinae	<i>Monochamus alternatus</i>	KF142090.1

## 2 结果与分析

### 2.1 COI、rDNA 基因克隆和序列分析

PCR 电泳结果如图 1 所示,用 4 对引物扩增后均获得单一条带,对扩增产物进行克隆和测序,结果为:COI 片段长 523 bp,18S rDNA 的 V4 和 V7 区分别为 387 bp、352 bp,28S rDNA D2 区序列长 447 bp。



M(mark) 为 DNA 标准分子量;COI、D2、V7、V4 分别对应线粒体 COI、28S rDNA D2、18S rDNA V4 和 V7 区的扩增片段 M: DNA molecular marker; COI, D2, V7, V4: the PCR products of partial COI, 28S rDNA D2, 18SrDNA V4 and V7 sequence.

图 1 PCR 产物电泳结果

Fig. 1 The electrophoresis result of PCR product

利用 MEGA 5.1 进行比对与序列分析,比对筛选到的(COI 20 种、18S rDNA V4 区 20 种及 V7 区 20 种、28S rDNA D2 区 20 种)共涉及到鞘翅目象甲科(包括外缘 3 个科)16 个亚科,24 个属,70 种,删除进化速度快的序用于序列分析,COI 序列碱基 A、T(U)、C、G 的平均含量分别为 30.68%、36.08%、14.98% 和 18.26%。系统发育除 28S rDNA 外均无碱基插入或缺失现象。COI 的 444 个核苷酸中变异位点 209 个,占全部位点的 47.1%,简约信息位点 178 个,占全部位点的 40.1%。最大似然法估计转换(Transition)/颠换(Transversion)的  $R$  值为 0.832,转换小于颠换;18S rDNA V4 和 V7 区碱基 A、T(U)、C、G 的平均含量分别为 21.75%、27.41%、28.72%、22.12% 和 20.45%、26.73%、29.45%、23.72%。18SrDNA V4 和 V7 区系统发育分析的位点分别为 340 和 351,变异位点分别为 18 个和 21,分别占全部位点的 5.3% 和 6.0%,简约信息位点 15 和 14 个,分别占全部位点的 4.4% 和 4.0%。最大似然法估计转换(transition)/颠换(transversion)的  $R$  值为 6.75 和 2.86,转换大于颠换;28SrDNA D2 区碱基 A、T(U)、C、G 的平均含量分别为 15.64%、22.25%、32.68%、29.43%。28S rDNA D2 区系统发育分析的位点为 461,变异位点为 182 个,占全部位点的 39.5%,简约信息位点 125 个,占全部位点的

27.1%。最大似然法估计转换/颠换的  $R$  值为 1.723,转换大于颠换。

### 2.2 遗传距离分析

2.2.1 COI 遗传距离 用 MEGA5.1 计算获得香樟齿喙象 COI 序列和其他象甲科昆虫及外种群的非校正  $P$  距离(见表 2~5),得到香樟齿喙象与欧洲松树皮象 *Hylobius abietis* 和 *Kyklioacalles provincialis* 遗传距离最为接近均为 0.151。其次与 *Naupactus ambiguus* 的遗传距离为 0.153。

2.2.2 18S rDNA 的遗传距离 从表 2 和表 3 可以看出,香樟齿喙象 18S rDNA V4 区序列与 *Pachylobius piceivorus* 遗传距离最为接近(0.006),其次是 *Eusomus ovulum*、*Acalles pinoides* 和 *Polydrusus sericeus*,均为 0.012,而 V7 区序列遗传距离最近的是 *Acalles pinoides*,遗传距离 0.009,其次是 *Hypera postica*、*Sciaphilus asperatus*、*Magdalis barbicornis*、*Bepharus ellipticus*、*Meira crassicornis*、*Gymnetron antirrhini*、*Sitona striatellus*、*Chrysolopus spectabilis*,遗传距离均为 0.011。

2.2.3 28S rDNA 遗传距离 28S rDNA 比对到的近缘种中遗传距离最近的是欧洲松树皮象、*Hylobius piceus*(0.036),其次是 *Trichalophus caudiculatus* 和 *Tranes lyteroides*,遗传距离分别是 0.087 和 0.089。

### 2.3 碱基替换饱和度和分析

由于 COI、18S rDNA(V4、V7)、28S rDNA(D2)序列分析的碱基置换度不同,因此在构建进化树前需要进行碱基置换饱和度分析,确保序列可以用于进化分析。以  $p$  距离作为横坐标,以碱基置换度作为纵坐标构建散点图(图 2),进行饱和度分析。其中 COI 基因的检测样本中,随着样本间遗传距离( $p$ -distance)的增大,碱基替换表现出不同的变化规律,碱基颠换与遗传距离呈明显线性关系,即随着遗传距离的增加,mtDNA COI 基因序列碱基转换和颠换数均呈直线增加;碱基颠换数则随着遗传距离的增加在 0.14 左右时超过转换数。总体上 mtDNA COI 基因序列碱基替换数与遗传距离呈显著的线性关系,表明香樟齿喙象等象甲科昆虫种间及种内的 mtDNA COI 基因的遗传变异丰富,该基因在物种进化中存在着巨大的进化潜能。18S rDNA 的 V4 和 V7 区,保守性较强,随着遗传距离的增加,碱基的颠换值趋于饱和,但碱基转换与  $p$  距离成线性关系,碱基突变未达到饱和,适用于进化树的构建。28S rDNA D2 区转换与颠换值与  $p$  距离均呈线性关系,碱基突变未达饱和,进化中存在着巨大的进化潜能,适用于进化树的构建。





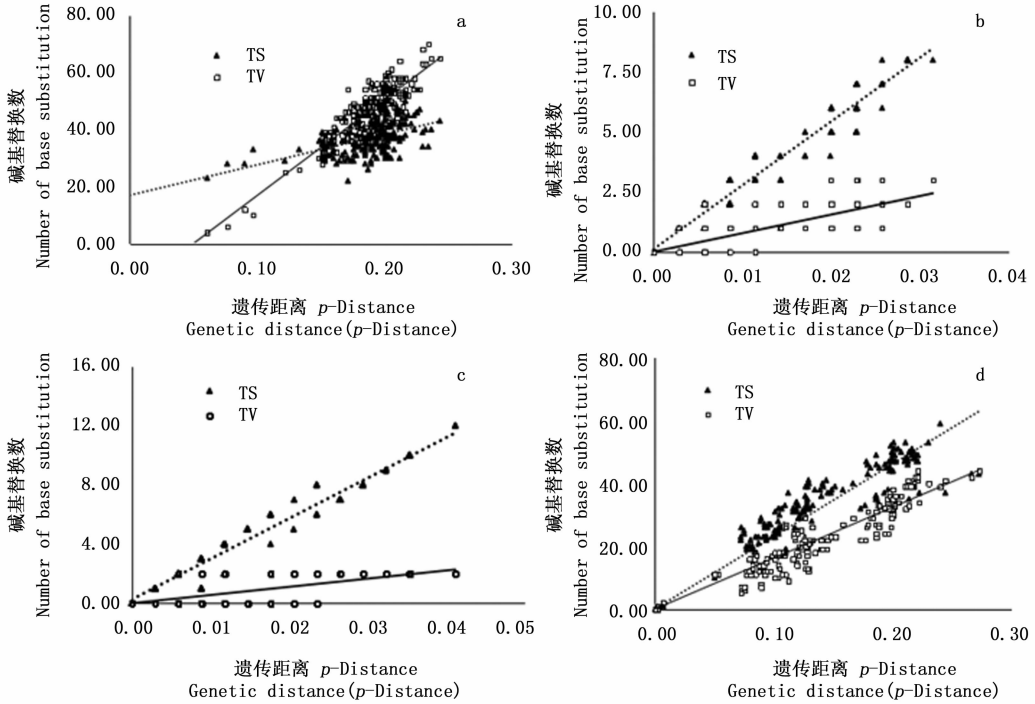


图2 香樟齿喙象 *P. tsushimanus* 及其近缘种 COI(a)、18S rDNA V4(b)、18S rDNA V7(c)、28S rDNA D2(d) 基因序列碱基饱和度分析

Fig. 2 Base saturation analysis of COI(a), 18S rDNA V4(b), 18S rDNA V7(c), 28S rDNA D2(d) genes from *Pagiophloeus tsushimanus* and related species.

## 2.4 进化树分析

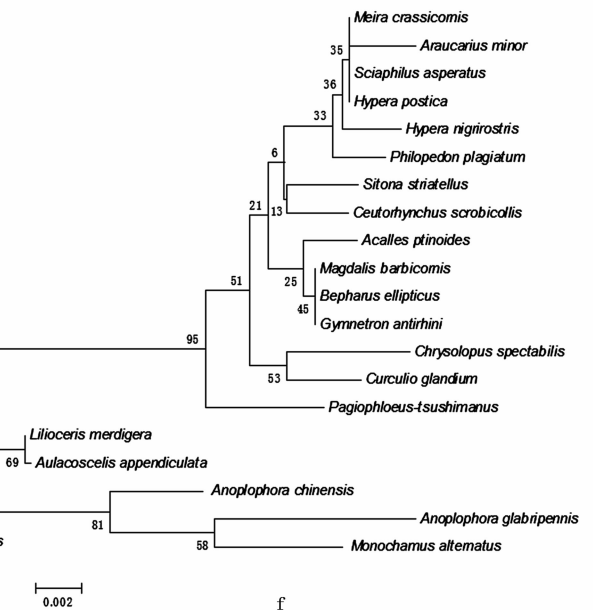
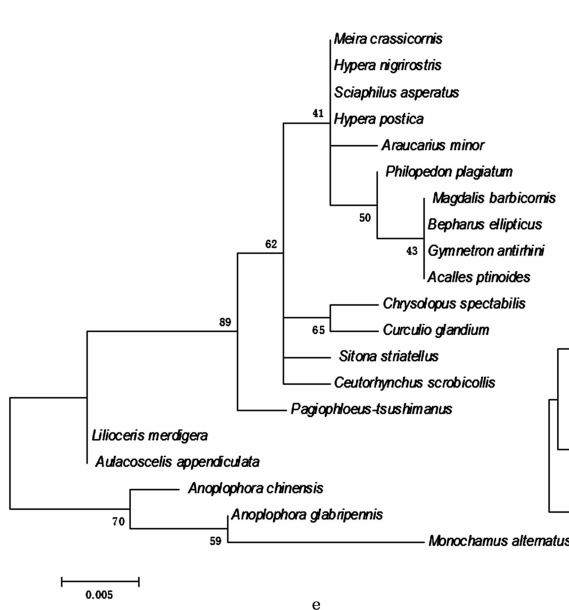
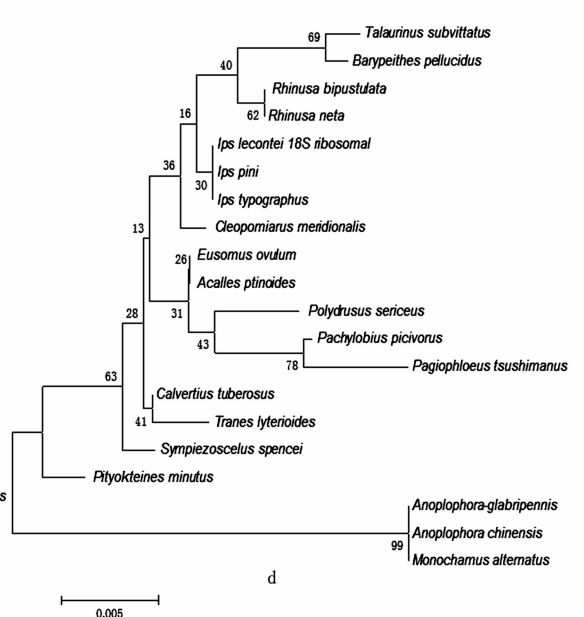
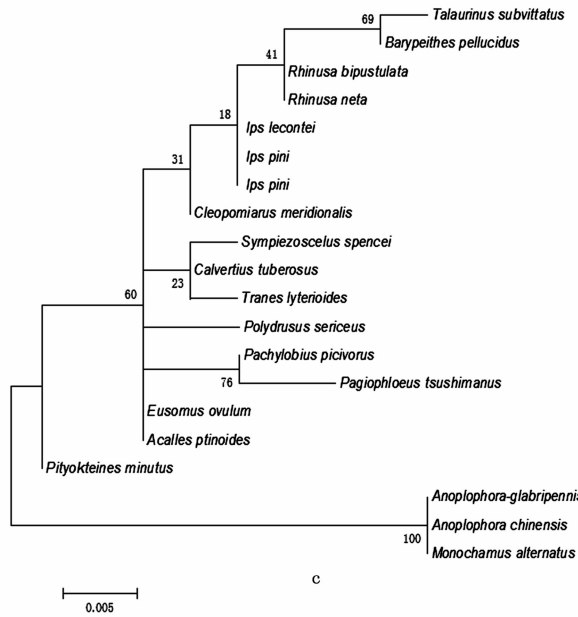
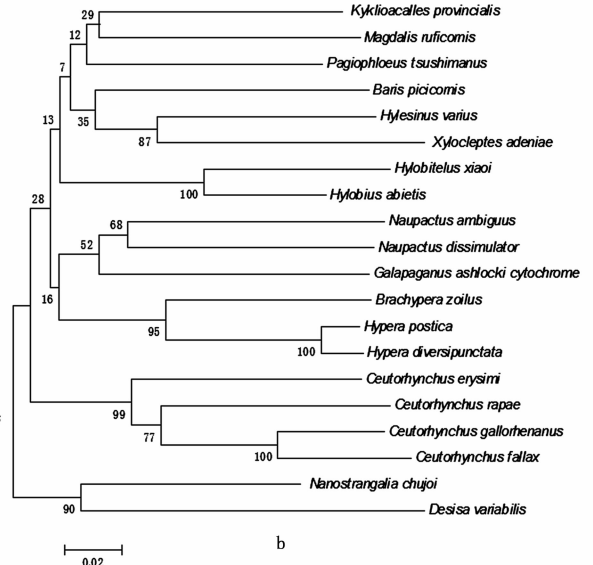
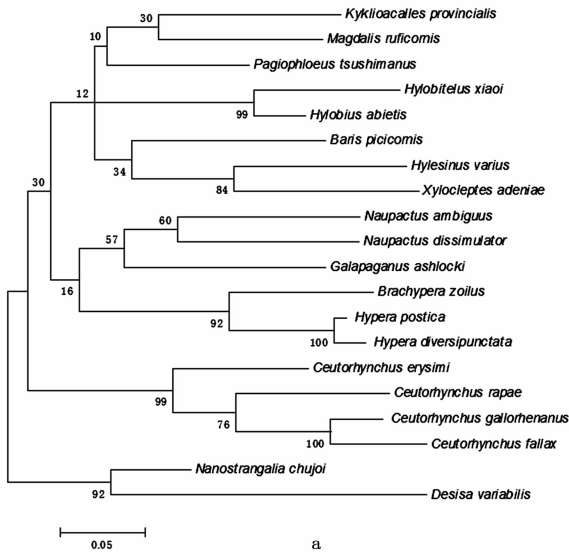
分别采用最大似然法、邻接法对香樟齿喙象扩增的四个序列片段构建系统发育树。通过比较 COI 与 rDNA 的进化树发现,两种方法构建的进化树中,COI 序列均和外源种形成两个独立分支,且在象甲科群系里香樟齿喙象与隐喙象亚科 Cryptorhynchinae 的 *Kykliaacalles provincialis* 和大盾象象亚科 Magdalininae 的 *Magdalis ruficornis* 聚为一个群系,随即又与萧氏松茎象以及欧洲松树皮象形成的节点聚在一起,但这一分支的置信度远低于 70%,与距离最远的是以鞘翅目为第二大分支的外源种群,即天牛亚科 Cerambycinae 的斑纹锈天牛 *Desisa variabilis* 和连纹小花天牛 *Nanostrangalia chujoi*,外源种群的比对能更直观、系统地体现香樟齿喙象的进化关系,同时避免产生长枝吸引现象。18S rDNA 序列无插入缺失现象,相较于 COI 基因序列保守,变异程度相对较低,在 V4 区序列构建的进化树中,与鞘翅目中的天牛科分化明显,并且与 *P. picivorus* 聚为一支,且置信度较高,最大似然法为 76%、邻接法(NJ)为 78%。V7 区序列构建的进化树中,香樟齿喙象与所有的象甲科种类聚在一起,与天牛科分化明显,遗传距离最远,香樟齿喙象以及其它象甲科种类形成的一个大

支与隐喙象亚科的 *Lilioceris merdigera* 和 *Aulacoscelis appendiculata* 形成姊妹分支。28S rDNA D2 区在进行比对时,有插入、缺失现象,加权分析后的进化树中,香樟齿喙象首先与魔喙象亚科树皮象族树皮象属 *Hylobius* 的欧洲松树皮象最先聚在一起,在两种方法得到的进化树中置信度均高达 99%。

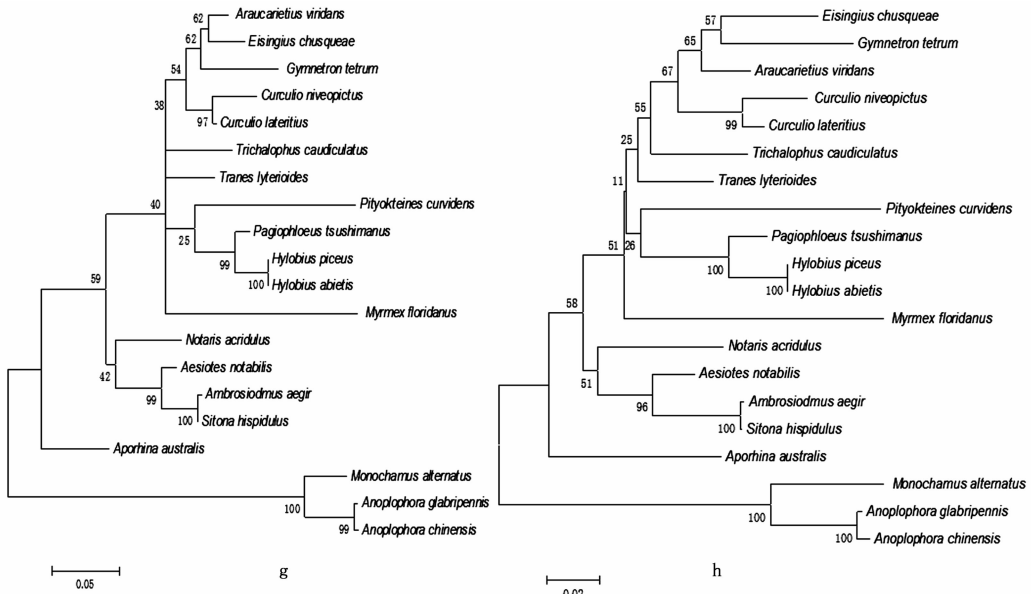
## 3 讨论

分子标记是重建生物系统发育关系的关键。目前在鞘翅目分子系统研究中应用较多的主要为:核基因(18S rDNA、28S rDNA)以及线粒体蛋白编码基因(COI、CO II、Cytb),其他分子标记的应用较少<sup>[24-27]</sup>,本研究中使用的 3 种分子标记分别为 COI、18S rDNA 和 28S rDNA。

昆虫线粒体和核基因的碱基组成具有不同的偏好性,COI 基因 A + T = 66.76%, C + G = 33.24%, A + T 含量明显高于 C + G 含量;18S rDNA 基因 V4 和 V7 区碱基 A + T 平均含量 48.17%, C + G 平均含量 51.83%, C + G 含量稍高于 A + T 含量;28S rDNA 基因 A + T 平均含量为 37.89%, C + G 平均含量为 62.11%, A + T 含量明显高于 C + G 含量,此结果印证了线粒体基因碱基组成 A + T 碱基偏好性、核基因







a. COI 基因 ML 法构建 b. COI 基因 NJ 法构建 c. 18S rDNA V4 基因 ML 法构建 d. 18S rDNA V4 基因 NJ 法构建 e. 18S rDNA V7 基因 ML 法构建 f. 18S rDNA V7 基因 NJ 法构建 g. 28S rDNA D2 基因 ML 法构建 h. 28S rDNA D2 基因 NJ 法构建节点数字表示 1000 次自检验的置信度 a. COI gene ML method b. COI gene NJ method c. 18S rDNA V4 gene ML method d. 18S rDNA V4 gene NJ method e. 18S rDNA V7 gene ML method f. 18S rDNA V7 gene NJ method g. 28S rDNA D2 gene ML method h. 28S rDNA D2 gene NJ method Numbers at nodes denote bootstrap values from 1 000 replicates

图3 香樟齿喙象 *P. tsushimanus* 及其近缘种基于 COI、18S rDNA V4、18S rDNA V7、28S rDNA D2 基因序列分子进化关系

Fig. 3 Molecular phylogenetic relationship of *Pagiophloeus tsushimanus* and related species based on COI, 18S rDNA V4, 18S rDNA V7, 28S rDNA D2 gene sequences

碱基组成 C + G 碱基偏好性的结论。序列分析结果显示,核基因的序列变异远低于线粒体基因,说明 18S rDNA 和 28S rDNA 相较于 COI 基因非常保守。由于某些种群出现核内无功能的线粒体假基因(nuclear mitochondrial DNAs, NUMTS)拷贝现象,以及可遗传的内共生体对线粒体 DNA 结构的影响,使核基因得到广泛应用<sup>[28-29]</sup>。线粒体 COI 碱基转换低于颠换,与鞘翅目橡象等昆虫的 COI 基因的研究结果相符<sup>[30]</sup>。

通过构建进化树,可以发现:香樟齿喙象与隐喙象亚科的 *Kyklioacalles provincialis*、大盾象象亚科的 *Magdalis ruficornis*、魔喙象亚科的萧氏松茎象以及欧洲松树皮象均有较近的亲缘关系。虽然 COI 分子标记可用于鉴定亲缘关系相近的种及种内的进化关系,且线粒体基因在评估某些近期分化中比核基因更为可靠,但置信度比较低,未能准确反应香樟齿喙象的亲缘关系,造成这种情况的原因可能是 GenBank 中收录的象甲 COI 基因序列数量有限,目前鞘翅目线粒体全基因组仅获得 83 个,对于物种多样性丰富的鞘翅目昆虫而言,这些基因组数据用于各方面研究还远远不够<sup>[31]</sup>。相较核外线粒体的结果,香樟齿喙象的分类地位得到了核内 18S rDNA 与 28S

rDNA 鉴定结果的支持。基于 18S rDNA 和 28S rDNA 序列构建的进化树中,香樟齿喙象都与魔喙象亚科树皮象族树皮象属聚在一起,且置信度超过 70%,尤其在 28S rDNA D2 区序列构建的进化树中,香樟齿喙象与魔喙象亚科树皮象族树皮象属的 *H. piceus*、欧洲松树皮象分支聚在一起置信度高达 99%。因此,本研究支持香樟齿喙象目前的分类地位,但其遗传多样性和种类的系统进化关系还需进一步探讨。

## 4 结论

本研究采用邻接法和最大似然法构建了 COI, 18S rDNA 和 28S rDNA 序列的系统发育树,分析香樟齿喙象与象甲科其它种类同源序列的碱基组成及系统进化特点。(1) COI 基因碱基组成具 A + T 碱基偏好性,核基因碱基组成具 C + G 碱基偏好性;(2) 香樟齿喙象 COI 遗传距离与欧洲松树皮象和隐喙象亚科 *K. provincialis* 最为接近,18S rDNA V4 区序列与魔喙象亚科树皮象族 *P. picivorus* 遗传距离最为接近,28S rDNA 中与香樟齿喙象遗传距离最近的是欧洲松树皮象和魔喙象亚科树皮象族 *H. piceus*。(3) 进化树分析可知,香樟齿喙象与同科同族

的魔喙象亚科树皮象族种类遗传距离最为相近,虽然无法比对到同属下的种类,但支持香樟齿喙象归属魔喙象亚科树皮象族。

## 参考文献:

- [1] 李巧. 中国象甲科分类研究综述[J]. 西南林学院学报, 2003, 23(3): 74-79.
- [2] 赵艳, 高晓余, 肖春. 象甲科昆虫寄主选择行为研究进展[J]. 农业灾害研究, 2014, 4(7): 8-21, 46.
- [3] 黄俊浩, 吴时英, 高磊, 等. 中国新记录种——香樟齿喙象的鉴别与为害[J]. 浙江农林大学学报, 2014, 31(5): 764-767.
- [4] Alonsozarazaga M A, Lyal C H C. A world catalogue of families and genera of Curculionoidea (Insecta: Coleoptera) (Excepting Scolytidae and Platypodidae)[M]. Barcelona Entomopraxis, 1999:202.
- [5] Faust J. Curculioniden aus dem Malayischen Archipel[J]. Stettiner Entomologische Zeitung, 1892, 53(7/9): 184-228.
- [6] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proceedings Biological Sciences, 2003, 270(1512): 313-321.
- [7] Hebert P D, Ratnasingham S, Dewaard J R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species[J]. Proceedings of the Royal Society Biological Sciences, 2003, 270(Suppl-1): S96-S99.
- [8] 魏子涵, 尹新明, 安世恒, 等. 利用分子标记 18S rDNA 对天牛高阶元进化关系的研究[J]. 应用昆虫学报, 2014, 51(02): 425-439.
- [9] Marvaldi A E. Higher level phylogeny of Curculionidae (Coleoptera: Curculionoidea) based mainly on larval characters, with special reference to broad-nosed weevils[J]. Cladistics, 1997, 13(4): 285-312.
- [10] Marvaldi A E, Morrone J J. Phylogenetic systematics of weevils (Coleoptera: Curculionoidea): A reappraisal based on larval and adult morphology[J]. Insect Systematics and Evolution, 2000, 31(1): 43-58.
- [11] Marvaldi A E, Sequeira A S, O'Brien C W, et al. Molecular and morphological phylogenetics of weevils (Coleoptera, Curculionoidea): do niche shifts accompany diversification? [J]. Systematic Biology, 2002, 51(5): 761-785.
- [12] 黄华平, 杨腊英, 王国芬, 等. rDNA 和 mtDNA 在昆虫系统发育与区系研究中的应用[J]. 热带生物学报, 2006, 12(4): 45-49.
- [13] 张健, 李晓强, 刘斐, 等. 基于线粒体 16S rDNA 基因的天牛科部分种类分子系统学研究(鞘翅目: 天牛科)[J]. 昆虫分类学报, 2010(S1): 1-7.
- [14] 张健, 张晓军, 任炳忠. 基于 28S rDNA 基因的天牛科部分种类的分子系统发育[J]. 林业科学, 2012, 48(10): 86-94.
- [15] 王志良, 张润志. 小蠹亚科的分类地位(鞘翅目, 象虫科)[J]. 动物分类学报, 2012, 37(2): 291-295.
- [16] 栾丰刚, 丁俊杰, 何龙喜, 等. 以线粒体 COI 基因探讨萧氏松茎象的分类地位[J]. 江西农业大学学报, 2013, 35(5): 906-913.
- [17] Loxdale H D, Lushai G. Molecular markers in entomology[J]. Bulletin of Entomological Research, 1998, 88(06): 577-600.
- [18] Raupach M J, Astrin J J, Hannig K, et al. Molecular species identification of Central European ground beetles (Coleoptera: Carabidae) using nuclear rDNA expansion segments and DNA barcodes[J]. Frontiers in Zoology, 2010, 7(1): 26.
- [19] Gillespie J J, Kjer K M, Duckett C N, et al. Convergent evolution of cucurbitacin feeding in spatially isolated rootworm taxa (Coleoptera: Chrysomelidae; Galerucinae, Luperini)[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2003, 29(1): 161-175.
- [20] 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.
- [21] Parchman T L, Geist K S, Grahnen J A, et al. Transcriptome sequencing in an ecologically important tree species: assembly, annotation, and marker discovery[J]. BMC Genomics, 2010, 11(1): 180.
- [22] Rota-Stabelli O, Telford M J. A multi criterion approach for the selection of optimal outgroups in phylogeny: Recovering some support for Mandibulata over Myriochelata using mitogenomics[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2008, 48(1): 103-111.
- [23] Chenna R, Sugawara H, Koike T, et al. Multiple sequence alignment with the clustal series of programs[J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(13): 3497-3500.
- [24] 常虹, 郝德君, 肖荣堂, 等. 基于线粒体 COI 基因的齿小蠹属昆虫 DNA 条形码研究[J]. 昆虫学报, 2012, 55(9): 1075-1081.
- [25] 聂瑞娥, 杨星科. 鞘翅目昆虫线粒体基因组研究进展[J]. 昆虫学报, 2014, 57(7): 860-868.
- [26] 贾晨曦. 我国北方金龟科甲虫分子标记和系统发育研究[D]. 沈阳, 沈阳大学, 2014.
- [27] Geiser M F, Haggmann R, Nagel P, et al. A first broad-scale molecular phylogeny of Prionoceridae (Coleoptera: Cleroidea) provides insight into taxonomy, biogeography and life history evolution[J]. Arthropod Systematics & Phylogeny, 2016, 74(1).
- [28] Lorenz J G, Jackson W E, Hanner R. The problems and promise of DNA barcodes for species diagnosis of primate biomaterials[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences, 2005, 360(1462): 1869-1877.
- [29] Xie L, Miao H, Hong X Y. The Two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch and the carmine spider mite *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) in China mixed in their Wolbachia phylogenetic tree[J]. Zootaxa, 2006, 1165: 3346.
- [30] 杨瑞生, 钟亮, 姜义仁, 等. 橡实象虫等 25 种昆虫线粒体 COI 基因的遗传多样性及系统进化分析[J]. 蚕业科学, 2011, 37(06): 985-992.
- [31] 孙田依. 锈赤扁谷盗和土耳其扁谷盗线粒体基因组特征及系统发育研究[D]. 江西, 南昌大学, 2016.