

花 婧,郑斯竹,安榆林,等. 基于线粒体 *COI* 基因的大小蠹属昆虫 DNA 条形码研究[J]. 江苏农业科学,2014,42(3):30-32.

基于线粒体 *COI* 基因的大小蠹属昆虫 DNA 条形码研究

花 婧¹, 郑斯竹¹, 安榆林², 杨晓军²

(1. 苏州出入境检验检疫局,江苏苏州 215000; 2. 江苏出入境检验检疫局,江苏南京 210000)

摘要:大小蠹属昆虫是重要的林木害虫,大部分种类是检疫性有害生物,我国口岸有多次截获记录。为加强对大小蠹属害虫的检疫鉴定,通过线粒体 DNA 细胞色素氧化酶 C 亚基 I 基因(*COI*)867 bp 片段序列对大小蠹属 17 个种类进行序列分析,结果表明,线粒体 *COI* 基因可作为大小蠹属昆虫分类的依据;DNA 条形码是生物系统分类分子水平上的依据。

关键词:大小蠹属;线粒体基因;遗传距离;*COI* 基因

中图分类号: S763.380.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)03-0030-03

目前,世界范围内已报道大小蠹属(*Dendroctonus*)昆虫 19 种^[1-2],作为鞘翅目中最进化的 1 个类群,其危害范围较广,是重要的森林害虫。大小蠹属为树皮小蠹类^[3-4],全部种类均侵食树干,成虫时初入入侵韧皮部,后筑母坑道于形成层与边材之间。一般情况下,大小蠹属只危害活的直立木和由于年龄、干旱或其他生物学因素导致的衰弱木,在盛发期也危害茁壮的健康树,寄主包括松属、云杉属、黄杉属和落叶松属等经济树种。

目前,昆虫鉴定以传统的形态学鉴定为主,该方法存在一定的缺陷,表型可塑性(phenotypic plasticity)和遗传可变性(genetic variability)容易造成鉴定结果不正确,无法鉴定许多群体中普遍存在的隐存分类单元,受生物性别和发育阶段的限制,很多生物无法被鉴定。现代交互式鉴定系统是昆虫鉴定的一个很大进步,但它要求专业技术很高,操作不正确就容易导致鉴定错误^[5]。快速准确的物种鉴定是深入开展行为学、生态学以及生理学等相关研究的必要前提和基础^[6]。

国内外大小蠹研究多集中于形态学分类,有关该类群分子鉴定技术的研究报道尚少。本研究通过对大小蠹属 *COI* 基因片段序列进行比对,对同源序列碱基多样性及系统进化关系进行分析,以期利用 DNA 条形码技术快速、准确地鉴定大小蠹种类,为进一步研究小蠹科昆虫分子鉴定技术提供理论依据和实践基础。

1 材料与与方法

1.1 昆虫种类及序列信息

本研究以大小蠹属 17 个种类作为研究对象(表 1),序列均从 GenBank 下载。

1.2 分析方法

应用 MEGA5.05 软件进行序列比对、拼接和剪切,基于 Kimura 2-parameter 模型,计算各分类单元之间的遗传距离及其标准差、序列碱基组成、保守位点、变异位点、转换/颠换比值等^[7]。应用 MEGA5.05 软件,使用邻接法(NJ)构建分子系统树,1 000 次循环估计系统树中节点的自举置信水平,碱基转换和颠换赋予相同的加权值,查看系统树^[8]。

2 结果与分析

2.1 mtDNA *COI* 基因序列组成和变异

应用 MEGA 5.05 软件对 17 个大小蠹 *COI* 基因序列比

收稿日期:2013-07-27

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2012BAK11B03);江苏出入境检验检疫局科技项目(编号:2012KJ55、2013KJ55)。

作者简介:花 婧(1990—),女,江苏苏州人,从事植物保护方面的研究。E-mail:huaj2702@163.com。

[5] Chen S Y, Zhao W S, Wang J. Genetic diversity and genetic differentiation of natural populations of *Pinus kesiya* var. *langbianensis* [J]. *Journal of Forestry Research*, 2002, 13(4): 273-276.

[6] 姜远标, 吴 涛, 陈少瑜, 等. 思茅松 RAPD 反应体系的优化 [J]. *东北林业大学学报*, 2007, 35(9): 16-19.

[7] 王曙光, 杨文武, 普晓兰. 思茅松大配子体 DNA 的提取及 ISSR 反应体系的建立 [J]. *四川林业科技*, 2012(2): 90-95.

[8] 姚鹏强, 李 培, 王曙光, 等. 思茅松 AFLP 分子标记体系的建立 [J]. *西南林业大学学报*, 2012, 32(6): 30-33.

[9] 周冬琴, 莫海波, 芦治国, 等. 基于 SRAP 标记的墨西哥落羽杉优良单株的遗传多样性分析 [J]. *植物资源与环境学报*, 2012, 21(1): 36-41.

[10] 齐 兰, 王文泉, 张振文, 等. 利用 SRAP 标记构建 18 个木薯品种的 DNA 指纹图谱 [J]. *作物学报*, 2010, 36(10): 1642-1648.

[11] 王大玮, 李 煜, 周 玮, 等. 杜仲 AFLP 反应体系的建立及优化 [J]. *西北农林科技大学学报:自然科学版*, 2010, 38(6): 88-94.

[12] Li G, Quiors C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 103: 455-461.

[13] 高亚卉, 朱广龙, 姬志峰, 等. 太行菊 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化 [J]. *实验室科学*, 2012, 15(1): 81-84.

[14] 刘 振, 赵 洋, 杨培迪, 等. 茶树 SRAP 反应体系优化及引物筛选 [J]. *茶叶通讯*, 2012, 39(4): 18-21.

[15] 张伟丽, 刘凤民, 刘 艾. 柱花草 SRAP-PCR 体系优化及其遗传多样性分析 [J]. *草业学报*, 2011, 20(4): 159-168.

[16] 赵 杨, 李玉璞, 代 毅. 华山松 SRAP-PCR 反应体系的优化 [J]. *西北林学院学报*, 2012, 27(5): 87-90, 173.

表1 供试昆虫及其基因序列信息

序号	种名	GenBank 登录号
1	间大小蠹(<i>D. adjunctus</i>)	AF067992
2	科罗大小蠹(<i>D. approximatus</i>)	AF068000
3	华山松大小蠹(<i>D. armandi</i>)	AF067990
4	西部松大小蠹(<i>D. brevicomis</i>)	AF068002
5	南部松大小蠹(<i>D. frontalis</i>)	AF067986
6	杰松大小蠹(<i>D. jeffreyi</i>)	AF067994
7	墨西哥大小蠹(<i>D. mexicanus</i>)	AF067988
8	云杉大小蠹(<i>D. micans</i>)	AF296557
9	穆氏大小蠹(<i>D. murrayanae</i>)	AF067989
10	山松大小蠹(<i>D. ponderosae</i>)	DQ866021
11	黄杉大小蠹(<i>D. pseudotsugae</i>)	AF067995
12	美云大小蠹(<i>D. punctatus</i>)	AF067998
13	根大小蠹(<i>D. rhizophagus</i>)	AF067993
14	红翅大小蠹(<i>D. rufipennis</i>)	DQ165449
15	落叶松大小蠹(<i>D. simplex</i>)	AF067985
16	黑脂大小蠹(<i>D. terebrans</i>)	AF375315
17	红脂大小蠹(<i>D. valens</i>)	EU040100

对剪齐后保留了869 bp的序列,其中第1个碱基为第1个氨基酸密码子的启示位点,为分析方便,共保留867 bp进行序

表2 大小蠹属17种昆虫COI基因序列组成统计

位点	ii	si	sv	R	TT	TC	TA	TG	CC	CA	CG	AA	AG	GG	合计
第1位点	264	15	4	3.63	75	13	2	1	37	1	0	84	2	69	283.32
第2位点	282	2	1	1.68	121	1	0	0	64	1	0	54	1	43	284.68
第3位点	186	58	37	1.58	84	40	26	3	10	7	1	90	18	2	281.19
合计	732	75	42	1.79	279	54	28	4	111	9	1	228	21	115	849.19

注:ii表示同义替换数量;si表示转换数;sv表示颠换数;R表示转换数与颠换数的比值。

2.3 遗传距离分析

在分子进化过程中,多重替换的存在严重干扰了序列之间真正的遗传距离估算,很难直接从已对准的序列中计算出真正的遗传距离。要解决这个问题,就需要对多重替换影响下的序列进行校正。现在有一些方法对序列进化过程作出了不同的假设,在这些假设条件下来估计序列上核苷酸的替换数目。参数越多,对进化过程的描述就越具体和详细,相对计

列分析。结果表明,在867个位点中没有插入和缺失现象,其中保守位点、变异位点和简约信息位点分别为525个、342个和248个,在867个位点中分别占60.6%、39.4%和28.6%;A、T、C、G平均含量分别为30.2%、37.9%、16.8%、15.1%,A+T含量较高,为68.1%。另外,虽然不同密码子的A、T、C、G含量不相同,但都表现出明显的A+T含量偏向性,特别是在密码子的第3位,A+T含量高达83.1%,与典型的昆虫线粒体DNA碱基组成一致。密码子第3位点G含量较少,只有4.6%,并且在不同种间差异较大(2.1%~7.4%),C含量在不同种群间差异也很大(6.4%~20.9%)。

2.2 碱基替换分析

采用MEGA5.05软件对所测基因序列替换数进行估计,由表2可见,17种大小蠹COI基因867个核苷酸序列中,核苷酸替换多为同义替换(ii)。全组数据转换与颠换的平均比值为1.79,在第1、2、3位点的比值分别为3.63、1.68、1.58,转换较为频繁,这是昆虫mtDNA的一个普遍特点;转换发生以C↔T为主(73.0%),颠换以A↔T为主(93.3%)。转换与颠换主要发生在密码子第3位点上,转换58个,其频率为总数的77.3%,颠换37个,其频率为总数的88.1%;第2位点最少,只有2个位点发生了转换,1个位点发生了颠换,这与第3位点承担较小的遗传压力有关。

算也越复杂。

基于Kimura 2-parameter,采用MEGA5.05软件分析大小蠹属17种昆虫之间的遗传距离^[9],并采用Bootstrap重抽样1000次进行检验。由表3可见,大小蠹属17种昆虫平均遗传距离为0.145,属间遗传距离介于0.083~0.191之间(>2%)。虽然大小蠹属各物种之间的亲缘关系十分接近,但可以达到分子水平不同种的鉴定要求。

表3 大小蠹COI基因Kimura-2参数校正距离(下三角)和标准差(上三角)

序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1		0.012	0.016	0.014	0.013	0.015	0.013	0.014	0.016	0.014	0.014	0.014	0.015	0.016	0.015	0.015	0.016
2	0.109		0.016	0.013	0.013	0.016	0.014	0.015	0.017	0.015	0.015	0.015	0.016	0.017	0.016	0.016	0.017
3	0.184	0.187		0.016	0.016	0.015	0.016	0.015	0.016	0.014	0.013	0.014	0.016	0.016	0.016	0.015	0.016
4	0.132	0.119	0.171		0.014	0.015	0.014	0.015	0.016	0.014	0.015	0.014	0.016	0.016	0.016	0.016	0.017
5	0.111	0.120	0.162	0.125		0.015	0.012	0.014	0.015	0.013	0.014	0.013	0.014	0.015	0.015	0.014	0.016
6	0.144	0.165	0.155	0.156	0.139		0.015	0.015	0.017	0.011	0.014	0.015	0.015	0.016	0.016	0.016	0.017
7	0.112	0.122	0.177	0.132	0.101	0.146		0.015	0.015	0.014	0.014	0.014	0.015	0.016	0.016	0.015	0.017
8	0.144	0.158	0.164	0.141	0.140	0.160	0.157		0.012	0.015	0.013	0.010	0.015	0.013	0.015	0.016	0.015
9	0.174	0.174	0.169	0.160	0.146	0.191	0.159	0.108		0.015	0.015	0.013	0.015	0.013	0.016	0.015	0.015
10	0.139	0.146	0.137	0.145	0.110	0.083	0.126	0.156	0.154		0.013	0.014	0.013	0.015	0.015	0.014	0.015
11	0.124	0.147	0.132	0.142	0.139	0.136	0.137	0.114	0.154	0.128		0.013	0.012	0.015	0.011	0.014	0.015
12	0.142	0.141	0.147	0.133	0.128	0.158	0.147	0.081	0.113	0.136	0.118		0.014	0.013	0.014	0.014	0.015
13	0.148	0.161	0.168	0.167	0.140	0.155	0.148	0.151	0.149	0.125	0.112	0.135		0.014	0.015	0.014	0.013
14	0.171	0.171	0.168	0.150	0.147	0.166	0.166	0.107	0.122	0.156	0.133	0.108	0.132		0.015	0.014	0.015
15	0.145	0.161	0.166	0.157	0.154	0.163	0.171	0.156	0.159	0.143	0.092	0.141	0.145	0.147		0.015	0.016
16	0.156	0.172	0.159	0.151	0.132	0.167	0.147	0.161	0.147	0.138	0.125	0.135	0.125	0.143	0.139		0.014
17	0.164	0.174	0.170	0.170	0.165	0.171	0.176	0.153	0.153	0.154	0.144	0.151	0.102	0.158	0.159	0.136	

2.4 大小蠹属 NJ 系统发育重建

以棟星天牛 (*Anoplophora horsfieldi*) 为外群, 采用 MEGA5.05 构建大小蠹属 17 个种的 NJ 分子系统树, 从构建的 NJ 树(图 1)来看, 华山松大小蠹、杰松大小蠹、山松大小蠹聚为 1 支, 科罗大小蠹、西部松大小蠹、间大小蠹、墨西哥大小蠹、南部松大小蠹聚为 1 支, 黄杉大小蠹和落叶松大小蠹聚为 1 支, 根大小蠹、红脂大小蠹、黑脂大小蠹聚为 1 支, 剩余几种聚为 1 支, 形成 5 大支格局。其中, 华山松大小蠹、杰松大小

蠹、山松大小蠹一支分化最快, 依次为南部松大小蠹所在支、黄杉大小蠹和落叶松大小蠹所在支、根大小蠹所在支, 云杉大小蠹所在支分化最慢, 这与形态学分类相一致。如山松大小蠹与杰松大小蠹、黄杉松大小蠹和落叶松大小蠹在形态学上相似, 在分子系统进化树上也同样关系相近, 且从遗传距离(表 2)看, 两者的遗传距离分别为 0.083 和 0.092 (>2%), 说明该段序列能够作为分子鉴定的依据。

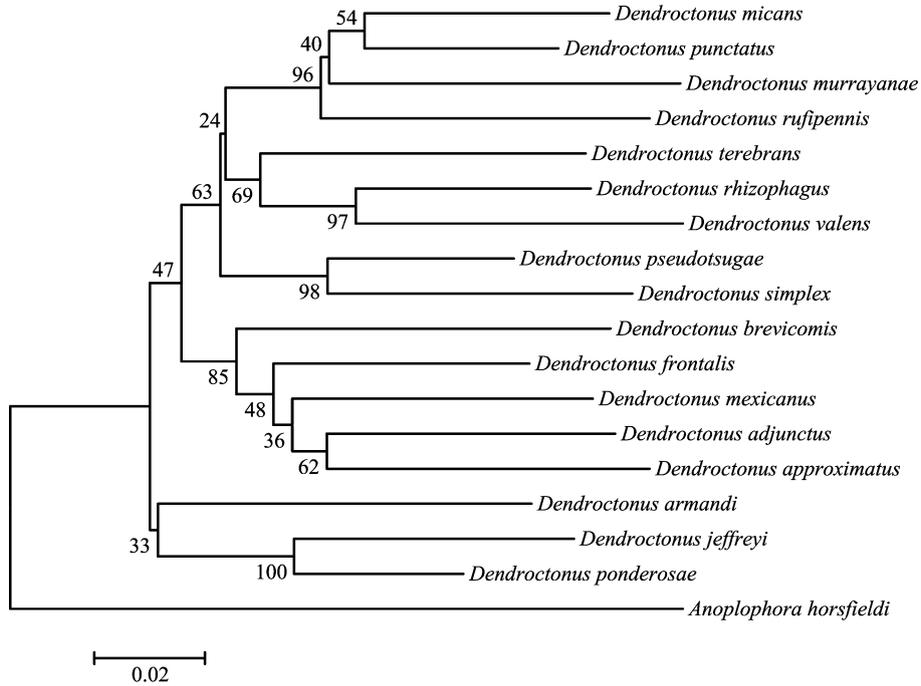


图1 大小蠹属17种昆虫的NJ系统发育树

3 小结与讨论

Hebert 等对包括脊椎动物和无脊椎动物界的 *CO I* 基因序列比较分析, 得出除腔肠动物外, 98% 物种的种内遗传距离差异为 0% ~ 2% 的结论。本研究各种大小蠹昆虫间的遗传距离表明, 该片段在种间平均距离为 0.145, 可以较好区分大小蠹属的不同种类。同时, 基于 Kimura 2-parameter 双参数模型构建的 NJ 树结果与形态学分类结果基本一致, 能满足种类鉴定的需要。

本研究利用 NCBI 中已公开的部分大小蠹 *CO I* 序列, 通过线粒体 *CO I* 基因序列比较, 分析各种间遗传距离及系统进化树构建, 发现利用该段序列能够较好地地区分近缘种, 且与形态学分类相似度高, 证实了基于线粒体 *CO I* 基因的 DNA 条形码技术在小蠹科大小蠹属昆虫分子鉴定上具有可行性, 既能够解决植物检疫中截获的大小蠹幼虫或残缺成虫的鉴定问题, 又能为小蠹科昆虫 DNA 条形码数据库的构建提供理论依据及实践基础。

参考文献:

[1] Wood S L. The bark and ambrosia beetles of north and central

America (Coleoptera: Scolytidae), a taxonomic monograph [M]. Proved: Brigham Young University, 1982.
 [2] 殷惠芬, 黄复生, 李兆麟. 中国经济昆虫志 第 29 册: 鞘翅目小蠹科 [M]. 北京: 科学出版社, 1984: 56 - 58.
 [3] Diaze E, Cisneros R, Zunigay G, et al. Comparative anatomical and histological study of the alimentary canal of *Dendroctonus parallelocollis*, *D. rhizophagus*, and *D. valens* (Coleoptera: Scolytidae) [J]. Annals of Entomological Society of America, 1998, 91 (4): 479 - 487.
 [4] Hopkins A D. Contributions toward a monograph of the scolytid beetles [M]. USDA: Bureau of Entomology Technical Bulletin, 1909.
 [5] 刘勇, 宋毓, 李晓宇. 基于线粒体 *CO I* 基因的 DNA 条形码技术在昆虫分子鉴定中的应用 [J]. 植物检疫, 2010, 24 (2): 46 - 50.
 [6] Dayrat B. Towards integrative taxonomy [J]. Biol J Linn Soc, 2005, 85 (3): 407 - 415.
 [7] 蒋青, 梁忆冰, 王乃扬, 等. 有害生物危险性评价的定量分析方法研究 [J]. 植物检疫, 1995, 9 (4): 208 - 211.
 [8] 田鹏, 刘占林. 分子系统发育树构建的简易方法 [J]. 生物信息学, 2009, 7 (3): 232 - 233.
 [9] 李培. 缘蝽科昆虫线粒体 *CO I* 基因的分子系统学研究 (半翅目: 异翅亚目) [D]. 西安: 陕西师范大学, 2007: 1 - 57.