

利用分子标记 18S rDNA 对天牛高阶元进化关系的研究*

魏子涵^{1**} 尹新明^{1***} 安世恒¹ 李京¹ 张鸿飞²

(1. 河南农业大学植物保护学院 郑州 450002; 2. 河南农业大学生命科学学院 郑州 450002)

摘要 【目的】构建天牛总科高阶元的进化关系,为解决天牛各亚科之间进化关系和归属提供依据。

【方法】本研究采用 18S rDNA (V4 V7 区)分子标记,分析和测定了 49 种天牛基因序列,并结合 GenBank 数据库中 3 科 2 亚科 21 种天牛的 18S rDNA 基因序列,采用邻近法 (Neighbor Joining, NJ)、贝叶斯推论法 (Bayesian Inference, BI) 和最大似然法 (Maximum Likelihood),对天牛总科 3 科 6 亚科的 70 种天牛基因序列构建进化树,探讨天牛高阶元类群的进化关系。【结果】研究表明:序列分析比对后得到序列为 703 bp,碱基 A、T、C、G 的含量分别为 21.1%、26.3%、23.6%和 28.9%;变异位点 (Variable sites) 98 个占全部位点的 13.9%,简约信息位点 (Parsimony informative sites) 45 个占全部位点的 6.4%;转换 (Transition)/颠换 (Transversion) 的平均值 R 值为 2.79,转换大于颠换。进化树结果显示沟胫天牛亚科 Lamiinae、天牛亚科 Cerambycinae、锯天牛亚科 Prioninae 和瘦天牛科 Disteniidae 为单系性进化群,这与传统形态学分类结果相似。【结论】本研究成功构建了天牛总科高阶元的系统发育树,研究证明 18S rDNA (V4、V7 区)是探讨天牛高阶元分类有效的分子标记。

关键词 天牛, 18S rDNA, 分子标记, 进化关系

Evolutionary relationships among the higher taxa of longicorn beetles (Coleoptera: Cerambycoidea) based on ribosomal 18S rDNA

WEI Zi-Han^{1**} YIN Xin-Ming^{1***} AN Shi-Heng¹ LI Jing¹ ZHANG Hong-Fei²

(1. College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Life Science of Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract [Objectives] To reconstruct relationships among the higher taxa of the Cerambycoidea to provide a foundation for further phylogenetic study of subfamilies in this taxon. [Methods] Phylogenetic relationships among 70 species representing 6 subfamilies and 3 families were investigated, including 49 newly sequenced species and 21 species for which gene sequences were obtained from the GenBank database. Partial ribosomal 18S rDNA (V4, V7) data were chosen to reconstruct phylogenetic trees based on Neighbor Joining (NJ), Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI) methods. [Results] Sequence analysis indicated that the 703 sites obtained after alignment contained 98 variable sites and 45 parsimony informative sites accounting for 13.9% and 6.4% of the total, respectively. The percentage of A, T, C, and G was 21.1%, 26.3%, 23.6% and 28.9%, respectively. The transition:transversion ratio reached 2.79. Phylogenetic trees based on Neighbor Joining (NJ), Bayesian Inference (BI) and Maximum Likelihood (ML) methods were consistent with the traditional morphological classification in indicating that the Lamiinae, Cerambycinae, Prioninae, Disteniidae are monophyletic groups. [Conclusion] Phylogenetic trees can be successfully reconstructed for higher taxa of the Cerambycoidea and the ribosomal

* 资助项目: 国家自然科学基金项目 (31071961)

**E-mail: weizihan_00@163.com

***通讯作者, E-mail: xinmingyin@hotmail.com

收稿日期: 2013-08-07, 接受日期: 2013-12-11

18S rDNA is a useful genetic marker for this task.

Key words longicorn beetles, 18S rDNA, molecular marker, evolutionary relationships

天牛科 Cerambycidae 隶属于鞘翅目 Coleoptera 天牛总科 Cerambycoidea, 全世界已记录 45 000 多种, 到 2005 年为止, 中国已记载 3 100 多种 (华立中等, 2009)。天牛的分类方法主要以形态学 (Švácha and Danilevsky, 1987; 尹新明, 1999; 王文凯, 1999)、细胞生物学和分子生物学等分类为主 (苏丽娟等, 2013)。传统的分类法对天牛各亚科间亲缘关系及起源的研究主要采用形态学、生物学以及古地理学方法 (Wang and Chiang, 1991), 然而关于天牛亚科间进化关系还存在很大的争议 (董抗震和杨星科, 2003)。借助分子方法对天牛各亚科之间进化关系的研究, 可与传统的形态学分类相结合, 为解决这些争议问题提供支撑依据。

目前采用分子标记法的研究主要有两种用途: 一种是用于鉴定未知种, 主要是线粒体 CO I 基因 (Cytochrome c oxidase subunit I, CO I), 由于该基因进化较快, Hebert (2003a, 2003b) 根据该基因的特性提出 DNA 条形码技术, 该技术一经提出后迅速在昆虫 (Hajibabaei *et al.*, 2006; 王哲等, 2013) 领域得到了广泛应用。另一种是物种的系统进化研究, 主要包括线粒体基因和核基因。线粒体基因进化较快, 适合种、属间的研究, Feng 等 (2010) 采用 12S rRNA、16S rRNA 和 CO I 基因对天牛科锯天牛族进行了研究; 核基因进化较慢, 通常用来做物种高级阶元的研究, Marvaldi 等 (2009) 利用 18S rDNA (V4-V5, V7-V9) 和 28S rDNA 对鞘翅目叶甲总科 (Chrysomeloidea) 和象甲总科 (Curculionoidea) 进行了研究。因此根据不同的研究目的, 选择一个更为适合的分子标记才是解决问题的关键。

我国利用分子标记法对天牛各亚科间关系的研究较少, 仅张健等 (2010, 2012) 分别用 16S rDNA 和 28S rDNA 对天牛亚科间做了研究, 然而其研究中涉及的种类仍不是很多。本研究通过对

天牛 18S rDNA (V4、V7 区) 进行测序, 结合 GenBank 上已有的天牛类群 18S rDNA 序列, 对天牛 3 科 6 亚科共 70 种天牛进行了研究, 从分子水平上研究天牛的分类方法和探讨亚科间的进化关系, 为天牛科高阶元分类研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试虫样来源及详细信息见表 1, 研究涉及的 70 种天牛均为成虫。标本的采集时间为 2008—2012 年, 主要位于河南省的南部和北部地区, 少数标本采于贵州、广州等地。标本采集后立刻保存于无水乙醇中, 随后更换 1~2 次。

本研究测序涉及到 49 种天牛, 其中沟胫天牛亚科 26 种、天牛亚科 12 种、锯天牛亚科 3 种、花天牛亚科 2 种、幽天牛亚科 3 种、狭胸天牛亚科 2 种、瘦天牛科 1 种。检索 GenBank 得到 21 种天牛。18S rDNA 序列共涉及天牛 70 种, 分属于 3 个科和 6 个亚科。

1.2 基因组 DNA 的提取

取 25 mg 天牛胸部肌肉于 1.5 mL 离心管中, 加入 250 μ L 匀浆缓冲液和 20 μ L 蛋白酶 K (上海生工), 充分研磨至天牛胸部肌肉组织完全裂解, 随后的步骤按照基因组试剂盒 (上海莱枫) 说明书进行操作。对抽提的基因组 DNA 用 NanoDrop 1000 紫外分光光度计 (Thermo Scientific, America) 进行浓度和纯度 ($OD_{260/280}$) 检测, 将检验大于 100 ng/ μ L 基因组 DNA 稀释至 80 ng/ μ L, 分为两份存放于 -20℃ 冰箱待用。

1.3 序列扩增

利用两对引物分别对 18S rDNA 的 V4 和 V7 区序列进行扩增, 其中 18S rDNA 的 V4 和 V7 区都在 300~400 bp 左右, 采用的是 Raupach 等 (2010) 发表的引物序列。

表 1 标本采集信息及 18S rDNA (V4、V7 区) 序列基因登录号
Table 1 Specimens collecting detail and GenBank accession number of 18S rDNA (V4, V7)

科/亚科 Family/Subfamily	种类 Species	来源 Derivation	采集时间 Collection date	GenBank 登录号 GenBank accession no.	
				18S rDNA	
				V4	V7
沟胫天牛亚科 Lamiinae	黄星天牛 <i>Psacotha hilaris</i> (Pascoe)	河南平顶山 Pingdingshan, Henan	2012.6	KF141946	KF142010
	光肩星天牛 <i>Anoplophora glabripennis</i> (Motschulsky)	河南平顶山 Pingdingshan, Henan	2012.6	KF141948	KF142012
	黄斑星天牛 <i>Anoplophora nobilis</i> (Ganglbauer)	河南平顶山 Pingdingshan, Henan	2008.6	KF141947	KF142011
	星天牛 <i>Anoplophora chinensis</i> (Forster)	河南禹州 Yuzhou, Henan	2010.7	KF141949	KF142013
	槐星天牛 <i>Anoplophora lurida</i> (Pascoe)	河南平顶山 Pingdingshan, Henan	2011.6	KF141950	KF142014
	樟泥色天牛 <i>Uraecha angusta</i> (Pascoe)	河南平顶山 Pingdingshan, Henan	2011.6	KF141951	KF142015
	双带粒翅天牛 <i>Lamiomimus gottschei</i> Kolbe	河南禹州 Yuzhou, Henan	2010	KF141953	KF142017
	苕麻双脊天牛 <i>Paraglenea fortunei</i> (Saunders)	河南平顶山 Pingdingshan, Henan	2011.6	KF141952	KF142016
	并脊天牛属 <i>Glenea</i> sp.	河南焦作 Jiaozuo, Henan	2012.5	KF141954	KF142018
	暗翅筒天牛 <i>Oberea fuscipennis</i> (Chevrolat)	河南南阳 Nanyang, Henan	2010	KF141955	KF142019
	筒天牛属 <i>Oberea</i> sp.1	河南焦作 Jiaozuo, Henan	2012.5	KF141956	KF142020
	筒天牛属 <i>Oberea</i> sp.2	河南焦作 Jiaozuo, Henan	2012.5	KF141957	KF142021
	三条小筒天牛 <i>Phytoecia sibirica</i> (Gebler)	河南焦作 Jiaozuo, Henan	2012.5	KF141958	KF142022
	双簇污天牛 <i>Moehotypa diphyis</i> (Pascoe)	河南济源 Jiyuan, Henan	2012.5	KF141959	KF142023
	二斑肖墨天牛 <i>Xenohammus bimaculatus</i> Schwarzer	广东南岭 Nanling, Guangdong	2012.5	KF141960	KF142024

续表 1 (Table 1 continued)

科/亚科 Family/Subfamily	种类 Species	来源 Derivation	采集时间 Collection date	GenBank 登录号 GenBank accession no.	
				18S rDNA	
				V4	V7
	松墨天牛 <i>Monochamus alternatus</i> Hope	贵州茂兰自然保护区 Maolan National Natural Reserve, Guizhou	2012.5	KF141961	KF142025
	桑缝角天牛 <i>Ropica subnotata</i> Pic	河南平顶山 Pingdingshan, Henan	2011.7	KF141962	KF142026
	柳坡天牛 <i>Pterolophia rigida</i> (Bates)	河南平顶山 Pingdingshan, Henan	2012.6	KF141963	KF142027
	拉氏锤天牛 <i>Phelipara radowskyi</i> Hua	贵州茂兰自然保护区 Maolan National Natural Reserve, Guizhou	2012.5	KF141964	KF142028
	桑勾天牛 <i>Exocentrus guttulatus subconjunctus</i> (Gressitt)	贵州茂兰自然保护区 Maolan National Natural Reserve, Guizhou	2012.5	KF141965	KF142029
	黑点粉天牛 <i>Olenecamptus clarus</i> Pascoe	贵州茂兰自然保护区 Maolan National Natural Reserve, Guizhou	2012.5	KF141966	KF142031
	云斑白条天牛 <i>Batocera lineolata</i> Chevrolat	河南平顶山 Pingdingshan, Henan	2012.6	KF141969	KF142033
	黑点象天牛 <i>Mesosa atrostigma</i> Gressitt	贵州茂兰自然保护区 Maolan National Natural Reserve, Guizhou	2012.5	KF141972	KF142036
	四点象天牛 <i>Mesosa myops</i> (Dalman)	河南郑州 Zhengzhou, Henan	2011.8	KF141973	KF142037
	峦纹象天牛 <i>Mesosa irrorata</i> Gressitt	河南平顶山 Pingdingshan, Henan	2012.6	KF141974	KF142038
	伪昏天牛 <i>Pseudanaesthetis langana</i> Pic	河南郑州 Zhengzhou, Henan	2012.6	KF141971	KF142035

续表 1 (Table 1 continued)

科/亚科 Family/Subfamily	种类 Species	来源 Derivation	采集时间 Collection date	GenBank 登录号 GenBank accession no.	
				18S rDNA	
				V4	V7
天牛亚科 Cerambycinae	葡萄脊虎天牛 <i>Xylotrechus pyrrhoderus</i> Bates	河南平顶山 Pingdingshan, Henan	2011.6	KF141975	KF142039
	连纹艳虎天牛 <i>Rhaphuma elongata</i> Gressitt	河南平顶山 Pingdingshan, Henan	2012.6	KF141976	KF142040
	六斑绿虎天牛 <i>Chlorophorus sexmaculatus</i> (Motschulsky)	河南平顶山 Pingdingshan, Henan	2012.6	KF141977	KF142041
	虎天牛属 <i>Clytus</i> sp.2	河南焦作 Jiaozuo, Henan	2012.5	KF141978	KF142042
	宽尾虎天牛 <i>Clytus</i> sp.1	河南平顶山 Pingdingshan, Henan	2011.6	KF141981	KF142045
	滨海长角虎天牛 <i>Teratoclytus plavilstshikovi</i> Zaitz	河南焦作 Jiaozuo, Henan	2012.5	KF141979	KF142043
	弧纹绿虎天牛 <i>Chlorophorus miwai</i> Gressitt	河南郑州 Zhengzhou, Henan	2012.6	KF141980	KF142044
	家茸天牛 <i>Trichoferus campestris</i> (Faldermann)	河南郑州 Zhengzhou, Henan	2011.6	KF141982	KF142046
	圆斑紫天牛 <i>Purpuricenus sideriger</i> Fairmaire	河南焦作 Jiaozuo, Henan	2012.5	KF141987	KF142051
	竹紫天牛 <i>Purpuricenus temminckii</i> (Guerin-Meneville)	贵州茂兰自然 保护区 Maolan National Natural Reserve, Guizhou	2012.5	KF141988	KF142052
	东亚纓天牛 <i>Allotraeus asiaticus</i> (Schwarzer)	河南平顶山 Pingdingshan, Henan	2012.6	KF141989	KF142053
	拟蜡天牛 <i>Stenygrinum quadrinotatum</i> Bates	河南平顶山 Pingdingshan, Henan	2012.6	KF141993	KF142057
	<i>Batyle suturalis</i> (Say)	GenBank		AF267407	AF267407
	<i>Elaphidion mucronatus</i> Say	GenBank		AJ841525	AJ841525

续表 1 (Table 1 continued)

科/亚科 Family/Subfamily	种类 Species	来源 Derivation	采集时间 Collection date	GenBank 登录号 GenBank accession no.	
				18S rDNA	
				V4	V7
	<i>Phymatodes testaceus</i> (Linnaeus)	GenBank		AY748116	AY748116
	<i>Megacyllene robiniae</i> (Forster)	GenBank		AF267404	AF267404
	<i>Dendrobias</i> sp.	GenBank		AF267403	AF267403
	<i>Clytus arietis</i> (Linnaeus)	GenBank		JN619110	JN619110
幽天牛亚科 Aseminae	赤短梗天牛 <i>Arhopalus unicolor</i> (Gahan)	广东广州 Guangzhou, Guangdong	2011.7	KF141998	KF142062
	褐梗天牛 <i>Arhopalus rusticus</i> (Linnaeus)	河南郑州 Zhengzhou, Henan	2011.7	KF141999	KF142063
	光胸断眼天牛 <i>Tetropium castaneum</i> (Linnaeus)	新疆秦岭 Qinling, Xinjiang	2012.6	KF142002	KF142066
花天牛亚科 Lepturinae	瘤胸金花天牛 <i>Gaurotes tuberculicollis</i> (Blanchard)	河南焦作 Jiaozuo, Henan	2012.5	KF142006	KF142070
	南方花天牛 <i>Leptura meridiosinica</i> Gressitt	广东南岭 Nanling, Guangdong	2012.5	KF142007	KF142071
	<i>Lepturinae</i> sp.	GenBank		AJ841535	AJ841535
	<i>Stenocorus meridianus</i> (Linnaeus)	GenBank		JN619111	JN619111
	<i>Typocerus velutinus</i> (Olivier)	GenBank		AJ841534	AJ841534
	<i>Leptura quadrifasciata</i> Linnaeus	GenBank		JN619084	JN619084
	<i>Alosterna tabacicolor</i> (DeGeer)	GenBank		JN619275	JN619275
	<i>Grammoptera abdominalis</i> (Stephens)	GenBank		JN619069	JN619069
	<i>Strangalia bicolor</i> (Swederus)	GenBank		EU815289	EU815289

续表 1 (Table 1 continued)

科/亚科 Family/Subfamily	种类 Species	来源 Derivation	采集时间 Collection date	GenBank 登录号 GenBank accession no.	
				18S rDNA	
				V4	V7
	<i>Strangalia luteicornis</i> (Fabricius)	GenBank		HM156709	HM156709
	<i>Anastrangalia sanguinolenta</i> (Linnaeus)	GenBank		JN619085	JN619085
	<i>Brachyleptura rubrica</i> (Say)	GenBank		AJ841531	AJ841531
	<i>Rhagium mordax</i> (DeGeer)	GenBank		AY748118	AY748118
瘦天牛科 Disteniidae	黑须天牛 <i>Cyrtonops asahinai</i> Mitono	河南平顶山 PingDingshan, Henan	2011.7	KF142008	KF142072
	<i>Nethinius acuticollis</i> Villiers	GenBank		AJ841526	AJ841526
	<i>Distenia limbata</i> Bates	GenBank		JN619273	JN619273
锯天牛亚科 Prioninae	中华薄翅天牛 <i>Megopsis sinica</i> (White)	河南郑州 Zhengzhou, Henan	2012.6	KF142003	KF142067
	沟翅土天牛 <i>Dorysthenes fossatus</i> Pascoe	河南禹州 Yuzhou, Henan	2010	KF142004	KF142068
	桔根接眼天牛 <i>Priotyrranus closteroides</i> (Thomson)	广东珠海 Zhuhai, Guangdong	2012.5	KF142005	KF142069
狭胸天牛亚科 Philinae	桔狭胸天牛 <i>Philus antennatus</i> (Gyllenhal)	广东珠海 Zhuhai, Guangdong	2012.4	KF142001	KF142065
	蔗狭胸天牛 <i>Philus pallescens</i> Bates	广东珠海 Zhuhai, Guangdong	2012.4	KF142000	KF142064
暗天牛科 Vesperidae	<i>Vesperus conicollis</i> Fairmaire & Coquerel	GenBank		AY748119	AY748119
	<i>Vesperus sanzi</i> Reitter	GenBank		AJ841541	AJ841541
外群 Outgroup					
肖叶甲亚科 Eumolpidae	中华萝蓼肖叶甲 <i>Chrysochus chinensis</i> Baly	河南新密 Xinmi, Henan	2009	KF142009	KF142073
象甲科 Curculionidae	<i>Araucarius minor</i> Kuschel	GenBank		FJ867736	FJ867736

引物分别为 18S rDNA CV4F (5'-TGGTGCCAGCAGCCGCGGTAA-3')、CV4R (5'-CCTCTAACGTCGCAATACGAATGCCC-3')、CV7F (5'-CTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACC-3') 和 CV7R (5'-GATTCCTTCAGTGTAGCGCGCGTG-3')。PCR 反应采用 25 μ L 体系, 包括 12.5 μ L 的 2 $\times$ Taq PCR Master Mix (上海, 莱枫), 正反引物各 1 μ L, 9.5 μ L ddH₂O, 1 μ L 的模板 DNA。18S rDNA V4, V7 区的扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min 后, 按以下参数进行 33 个循环, 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 67 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 循环完毕后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物经过 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测后, 对扩增结果较好的样品通过 PCR 纯化试剂盒纯化 (Axygen Scientific, 杭州), 然后委托上海生工公司对样品进行正反双向测序, 测序仪为 ABI-PRISM3730, 测序试剂为 BigDyeterminator v3.1。

1.4 序列处理与分析方法

首先将获得的序列提交至 NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行同源性比对, 以防止外源基因的污染。然后用 Chromas 2 (Technelysium Pty Ltd, Australia) 对 DNA 序列进行峰值观察, 并用软件 MEGA 5.1 (Tamura *et al.*, 2011) 进行正反链的拼接, 再通过 Clustal X 2.1 (Larkin *et al.*, 2007) 软件对所有序列进行同源性比对。最后经过拼接比对后得到序列全长为 703 bp, 用 MEGA5.1 软件 (Tamura *et al.*, 2011) 统计核苷酸 A、T、C、G 的组成、变异位点 (Variable sites) 比例、简约信息位点 (Parsimony informative sites) 比例、转换值 (Transition, TS)、颠换值 (Transversion, TV)、亚科间的非校正 P 距离 (Uncorrected P-distance), 并进行饱和度分析。

1.5 模型选择及进化树构建

邻近法 (NJ) 构建进化树借助 MEGA5.1 软件 (Tamura *et al.*, 2011) 进行。贝叶斯推论法 (BI) 构建进化树前利用 Modeltest 3.7 (Posada

and Crandall, 1998) 选择最佳替换模型 (GTR), 然后借助 MrBayes3.2.1 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) 构建, 最大似然法 (ML) 构建进化树借助在线生物信息学工具 phyML3.0 (Guindon *et al.*, 2005) 构建 (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>), 参数设置如下: 替代模型 (Substitution model) 选择 “GTR”, 不变位点比例 (Proportion of invariable sites) 选择 “estimated”, 替代率类别数 (Number of substitution rate categories) 设为 “6”, 树形提高策略选择 “SPR”, 同时运行 aBayes 测试对进化树评估, 其余参数用默认设置, 进化树用 FigTree 1.3.1 (Rambaut and Drummond, 2009) 软件打开。

2 结果与分析

2.1 序列测定与基因登录号

对 18S rDNA (V4、V7 区) 测序, 涉及到 49 种天牛, 其中沟胫天牛亚科 Lamiinae 26 种、天牛亚科 Cerambycinae 12 种、锯天牛亚科 Prioninae 3 种、花天牛亚科 Lepturinae 2 种、幽天牛亚科 Aseminae 3 种、狭胸天牛亚科 Philinae 2 种、瘦天牛科 Disteniidae 1 种。利用两对引物分别对 18S rDNA 的 V4 和 V7 区序列进行扩增, 结果显示: 18S rDNA 的 V4 和 V7 区都在 300 ~ 400 bp 左右。49 种天牛基因登录号分别为: V4: KF141946 ~ KF142008; V7: KF142010 ~ KF142072 (表 1)。检索 GenBank 数据库得到 21 种天牛序列与登录号 (表 1), 结合新得到的 49 条 18S rDNA 序列, 本研究共涉及 70 种天牛, 分属于 6 个亚科和 3 个科。

2.2 序列分析

利用 MEGA 5.1 进行比对与序列分析, 结果表明: 碱基 A、T、C、G 的平均含量分别为 21.1%、26.3%、23.6% 和 28.9%。系统发育分析的 703 个位点中变异位点 98 个, 占全部位点的 13.9%, 简约信息位点 45 个, 占了全部位点的 6.4%。转换 (Transition) / 颠换 (Transversion) 的平均值

R 值为 2.79, 转换大于颠换。

2.3 遗传距离分析

用 MEGA5.1 对天牛各个亚科进行遗传距离分析, 非校正 P 距离分析结果见表 2。沟胫天牛亚科与天牛亚科之间距离最近 (0.014), 天牛亚科与锯天牛亚科之间距离最近 (0.007), 幽天牛亚科与花天牛亚科以及瘦天牛科之间的距离最近 (0.020), 狭胸天牛亚科与暗天牛科的距离最近 (0.020), 瘦天牛科与花天牛亚科的距离最近 (0.019) (表 2)。

2.4 碱基替换饱和度分析

以非校正 P 距离作为横坐标, 分别以各碱基的转换和颠换值为纵坐标作图, 进行饱和度分析 (图 1)。结果显示: 转换与颠换都随着非校正 P 距离成线性关系, 碱基突变未达到饱和, 因此可以用作构建进化树分析。

2.5 进化树拓扑结构分析

采用邻近法 (NJ)、贝叶斯推论法 (BI) 和最大似然法 (ML) 构建进化树 (图 2~图 4)。

3 种建树方法结果都表明所有的天牛类群聚集在一起, 明显与外群分开。在 NJ 树 (图 2)、BI 树 (图 3) 和 ML 树 (图 4) 中都分为了 3 个主要的聚类簇, 并具有相似的拓扑结构。位于进化树顶部的是沟胫天牛亚科, 位于进化树基部的是暗天牛科。然而在进化树中部存在着差异: NJ 树中花天牛亚科与沟胫天牛亚科较天牛亚科近; 天牛亚科与锯天牛亚科位于 B 枝, 这与 BI 树和 ML 树的结果不相同。此外, 进化树都支持了沟胫天牛亚科、锯天牛亚科、天牛亚科、瘦天牛科是单系类群。

3 讨论与结论

本研究利用 MEGA 5.1 (Tamura *et al.*, 2011) 对自行测定的 2 科 6 亚科 49 种天牛 18S rDNA (V4、V7 区) 序列与 GenBank 数据库上 3 科 2 亚科 21 种天牛的同源序列进行分析, 结果表明: 18S rDNA (V4 V7 区) 序列保守位点占了 86.1%, 是高度保守的序列适合高阶元分类的研究。这与刘殿锋和蒋国芳 (2005) 的结论一致。

本研究中 NJ 树、ML 树以及 BI 树的结果表明: 狭胸天牛亚科和暗天牛科位于进化树基部,

表 2 天牛亚科之间非校正 P 距离
Table 2 Uncorrected P-distance between the cerambycid subfamilies

Index	科/亚科 Family/Subfamily	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	沟胫天牛亚科 Lamiinae		0.003	0.005	0.005	0.004	0.004	0.005	0.004	0.005
2	天牛亚科 Cerambycinae	0.014		0.005	0.004	0.003	0.003	0.005	0.003	0.005
3	幽天牛亚科 Aseminae	0.024	0.022		0.005	0.005	0.004	0.004	0.005	0.006
4	狭胸天牛亚科 Philinae	0.030	0.023	0.031		0.005	0.005	0.005	0.004	0.006
5	锯天牛亚科 Prioninae	0.017	0.007	0.022	0.024		0.003	0.005	0.003	0.004
6	花天牛亚科 Lepturinae	0.018	0.014	0.020	0.025	0.013		0.004	0.003	0.005
7	瘦天牛科 Disteniidae	0.025	0.023	0.020	0.034	0.022	0.019		0.005	0.006
8	暗天牛科 Vesperidae	0.015	0.008	0.021	0.020	0.008	0.012	0.021		0.005
9	外群 Outgroup	0.030	0.027	0.038	0.040	0.024	0.029	0.033	0.025	

注：亚科之间非校正 P 距离（下三角）以及标准差（上三角）。

Uncorrected P-distance (lower triangle) and standard error (upper triangle) between the Cerambycid subfamilies.

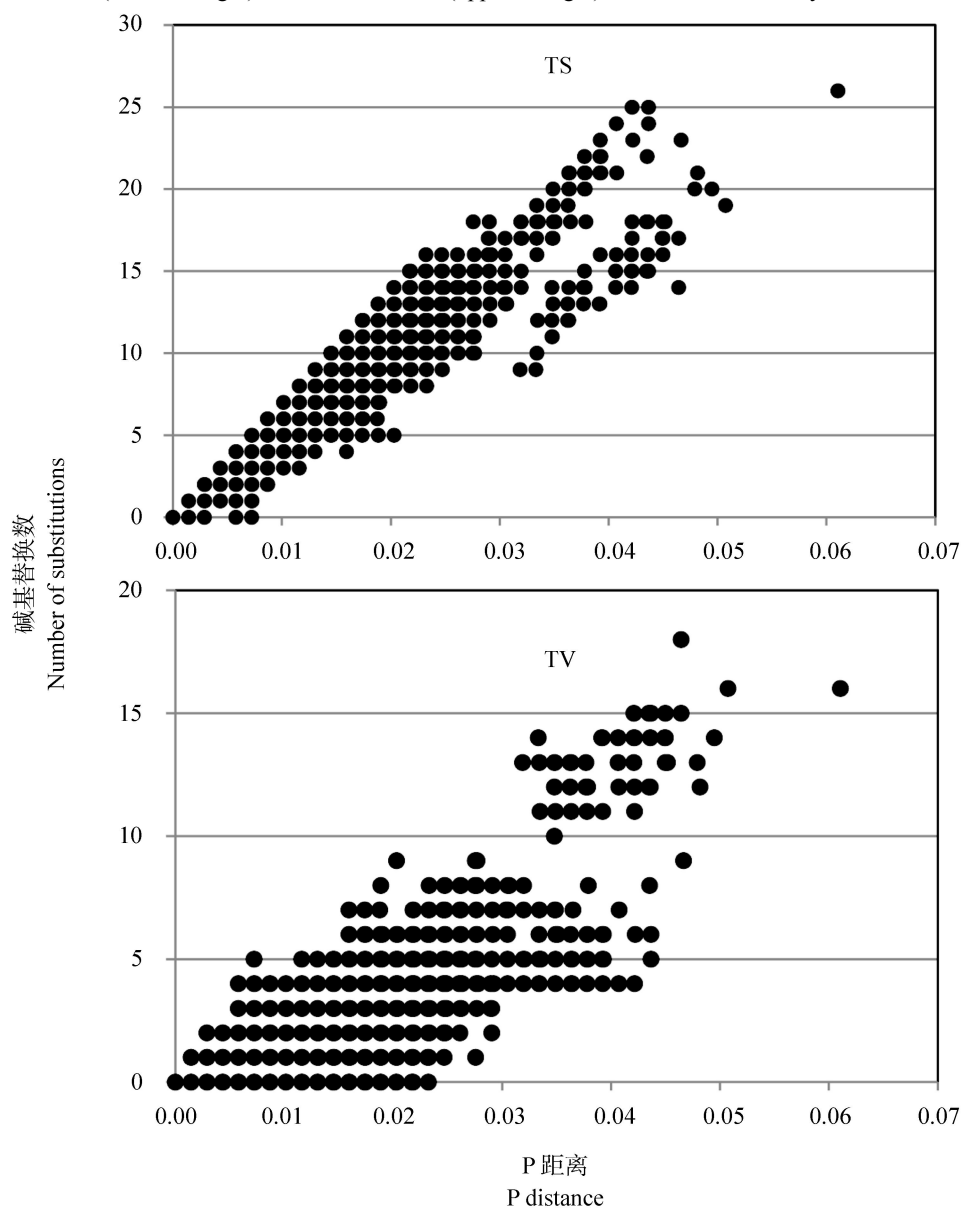


图 1 18S rDNA (V4、V7 区) 序列饱和度分析
Fig. 1 Saturation degree analysis of 18S rDNA (V4, V7)

应当为较古老的类群。关于狭胸天牛与暗天牛的亲缘关系有很多讨论, Švácha 等 (1997) 将狭胸天牛亚科划入暗天牛科; 尹新明 (1999) 对狭胸天牛形态学以及生物学进行研究, 结果表明狭胸天牛亚科与暗天牛科最为近缘。在本研究中狭胸天牛与暗天牛科聚在一起, 支持了狭胸天牛亚科与暗天牛科近缘的结论。花天牛亚科分类地位

在本研究中是有不确定性的, NJ 树、BI 树和 ML 树并没有得到一致的结果。NJ 树中花天牛亚科位于 C 枝, 分化时间较晚与沟胫天牛亚科具有近缘的关系, 而在 BI 树和 ML 树中花天牛亚科位于 A 枝。蒋书楠和陈力 (2001) 在《中国动物志》昆虫纲-花天牛亚科中, 对花天牛的分类地位问题进行了详细的阐述, 认为花天牛并不算

是很古老的种群,这与地球上显花植物的出现时间有关。本研究中 NJ 树的结果支持了该结论,

NJ 树的拓扑结构表明:花天牛位于幽天牛亚科与沟胫天牛亚科之间并且较晚分化,因此花天牛

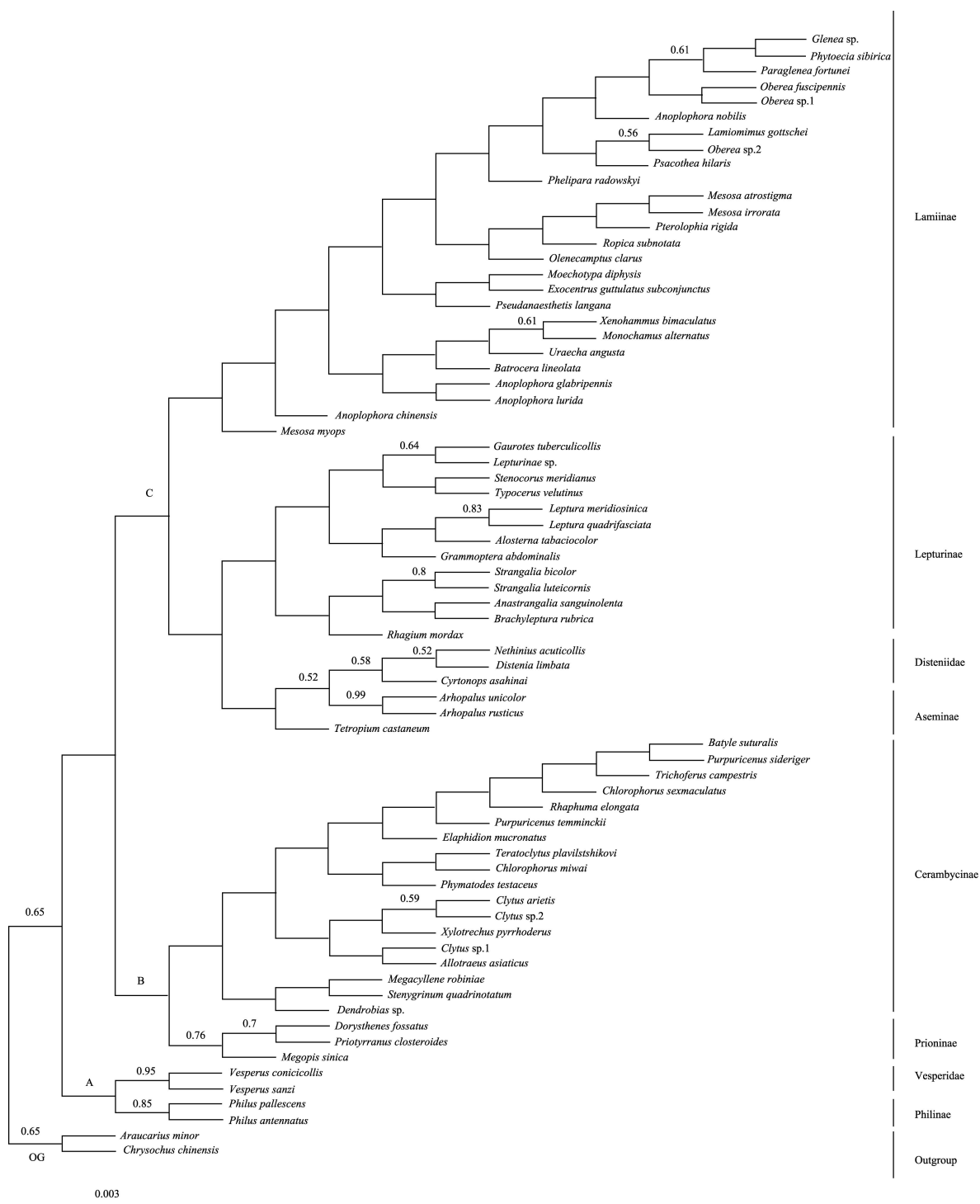


图 2 基于 18S rDNA (V4、V7 区) 构建的距离树进化树枝显示大于 0.5 的 bootstrap 值
Fig. 2 NJ phylogeny tree based on 18S rDNA (V4, V7) bootstrap value above 0.5 was labeled on the interior tree branch

注: A 枝由狭胸天牛亚科和暗天牛科组成; B 枝由锯天牛亚科和天牛亚科组成; C 枝由幽天牛亚科、瘦天牛科、花

天牛亚科和沟胫天牛亚科组成。

A branch includes Vesperidae and Philinae; B branch includes Prioninae and Cerambycinae; C branch includes Aseminae, Disteniidae, Lepturinae and Lamiinae.

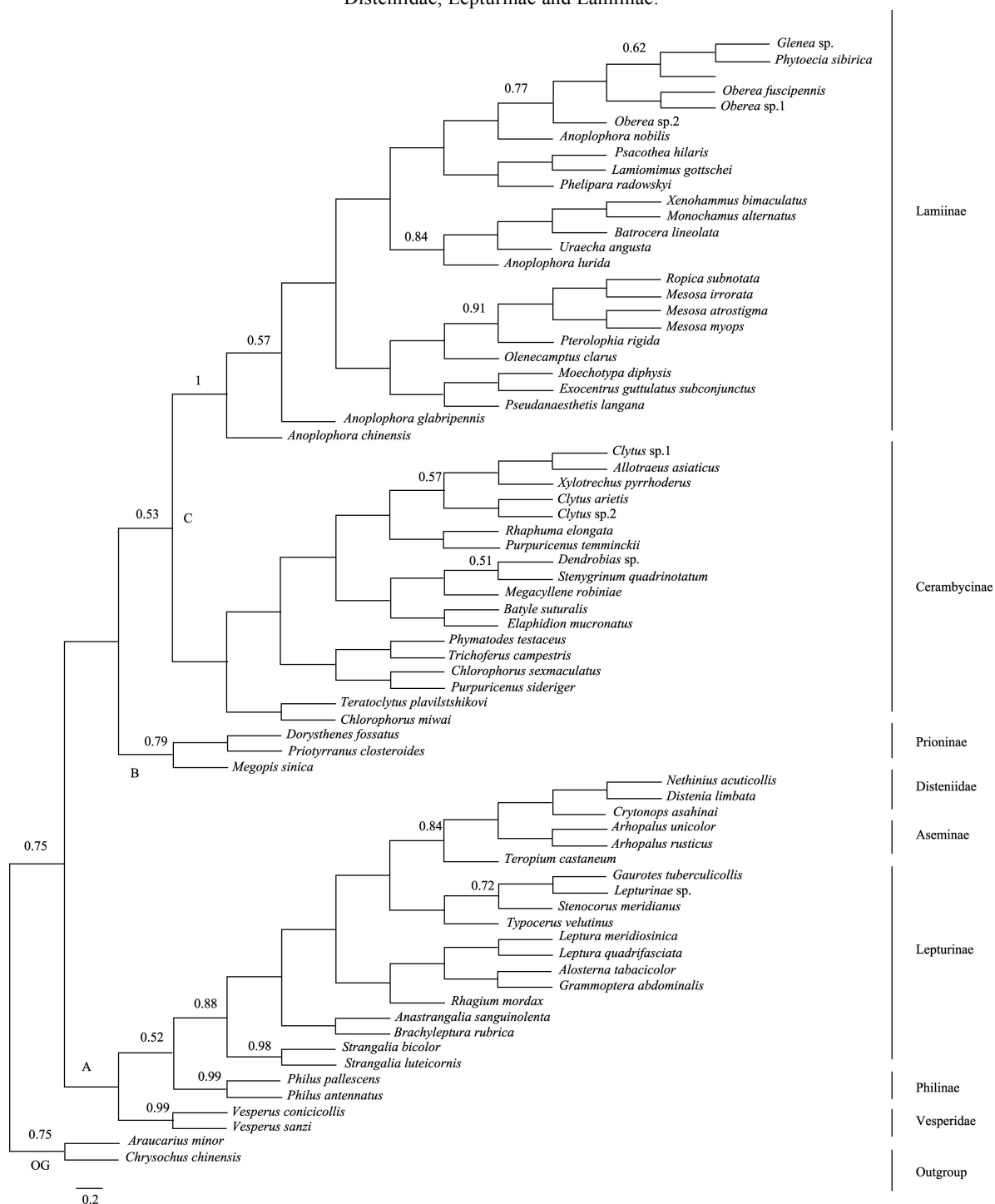


图3 基于 18S rDNA (V4, V7 区) 构建的贝叶斯树进化枝显示大于 0.5 的后验概率值
Fig. 3 BI phylogeny tree based on 18S rDNA (V4, V7) posterior probability above 0.5 was labeled on the interior tree branch

注: A 枝由暗天牛科、狭胸天牛亚科、花天牛亚科、幽天牛亚科和瘦天牛科组成; B 枝由锯天牛亚科组成; C 枝由

A branch includes Vesperidae, Philinae, Lepturinae, Aseminae and Disteniidae; B branch include Prioninae; C branch includes Lamiinae and Cerambycinae.

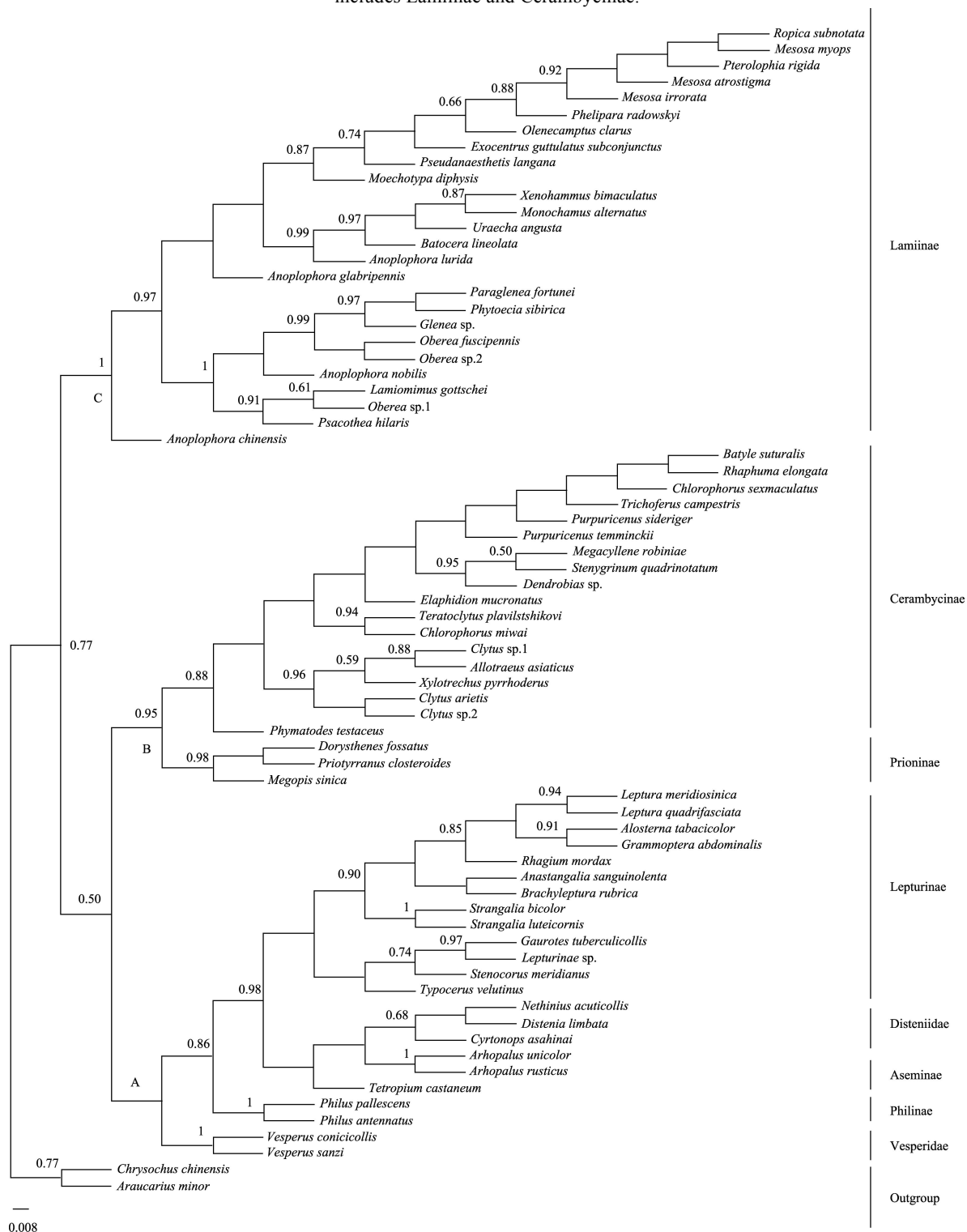


图 4 基于 18S rDNA (V4、V7 区) 构建的最大似然树进化枝显示大于 0.5 的 aBayes 值

Fig. 4 ML phylogeny tree based on 18S rDNA (V4, V7) aBayes values above 0.5 was labeled on the interior tree branch

注: A 枝由暗天牛科、狭胸天牛亚科、幽天牛亚科、瘦天牛科和花天牛亚科组成; B 枝由锯天牛亚科和天牛亚科组成;

C 枝由沟胫天牛亚科组成。

A branch includes Vesperidae, Philinae, Aseminae, Disteniidae and Lepturinae; B branch includes Prioninae and Cerambycinae; C branch include Lamiinae.

不算非常古老种群。虽然 BI 树和 ML 树与 NJ 树在花天牛亚科存在着差异,然而却有一个共同的特点:花天牛亚科与幽天牛亚科以及瘦天牛科位于一个大的聚类簇上,因此三者之间的亲缘关系值得做进一步的研究。沟胫天牛亚科是单系群,位于进化树的顶部,分化相对与狭胸天牛所在的 A 枝(图 2)和锯天牛所在的 B 枝(图 3)较晚,判定为较进化的类群。这与王文凯(1999)根据天牛总科雌性生殖器的受精囊及骨化程度得出的结论一致,但是该结果与王乔(1986)结合古生物学和古地理学对天牛各亚科起源研究所得到的结论不一致。此外,3 种进化树的结果均表明:锯天牛亚科与天牛亚科较近缘并且早于天牛亚科分化,该结果与王文凯和尹新明(2002)以天牛雌性生殖器结构作为主要特征研究得到的结论相一致。

本文利用 18S rDNA (V4、V7 区)序列的研究表明:以 18S rDNA 做为分子标记在亚科内的解析度并不是很高,适合用于亚科及亚科以上阶元的分类研究。单基因构建的进化树会存在着一定的差异,并不能非常准确地反映物种的真实进化关系,这种差异可能在亚科内以及亚科间都存在。比如在本研究中,花天牛的分类地位以及亚科内的解析水平,都没有很好地解决。这可能由于不同基因具有不同的进化速率和不同的遗传信息,联合不同的基因分析会增加进化树的解析力。因此,建议在以后的研究中,采用多基因联合分析的方法,可能会更真实地反映物种进化关系,为解决天牛总科高阶元进化问题提供依据。

参考文献 (References)

- Feng B, Chen L, E YL, Zheng KD, 2010. Phylogenetic analysis of Prionini(Coleoptera: Cerambycidae: Prioninae)from China based on mitochondrial ribosomal RNA genes and Cytochrome oxidase I gene. *Zootaxa*, 2(487): 1–18
- Guindon S, Lethiec F, Duroux P, Gascuel O, 2005. PHYML online—a web server for fast maximum likelihood-based

- phylogenetic inference. *Nucleic Acids Research*, 33(Suppl 2): W557–W559.
- Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, Hallwachs W, Hebert PD, 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(4): 968–971.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR, 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512): 313–321.
- Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR, 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(Suppl 1): S96–S99.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21): 2947–2948.
- Marvaldi AE, Duckett CN, Kjer KM, Gillespie JJ, 2009. Structural alignment of 18S and 28S rDNA sequences provides insights into phylogeny of Phytophaga (Coleoptera: Curculionioidea and Chrysomeloidea). *Zoologica Scripta*, 38(1): 63–77.
- Posada D, Crandall KA, 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14(9): 817–818.
- Rambaut A, Drummond A, 2009. FigTree v1. 3.1. Computer program and documentation distributed by the author at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software>.
- Raupach MJ, Astrin JJ, Hannig K, Peters MK, Stoeckle MY, Wägele JW, 2010. Molecular species identification of Central European ground beetles(Coleoptera: Carabidae)using nuclear rDNA expansion segments and DNA barcodes. *Frontiers in Zoology*, 7(26):1–15.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP, 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12): 1572–1574.
- Švácha P, Danilevsky ML, 1987. Cerambycoid larvae of Europe and Soviet Union(Coleoptera, Cerambycoidea) Part II. *Acta Universitatis Carolinae (Biologica)*, 31(3/4): 121–284.
- Švácha P, Wang JJ, Chen SC, 1997. Larval morphology and biology of *Philus antennatus* and *Heterophilus punctulatus*, and systematic position of the Philinae(Coleoptera: Cerambycidae and Vesperidae). *Annales de la Société Entomologique de France, Paris(N. S.)*, 33(3): 323–369.

- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10): 2731–2739.
- Wang Q, Chiang SN, 1991. The evolution in the higher taxa of the Cerambycidae(Coleoptera). *Entomotaxonomia*, XII(2): 93–114.
- 董抗震, 杨星科, 2003. 天牛科高级阶元分类研究进展. 昆虫知识, 40(3): 211 – 217. [Dong KZ, Yang XK, 2003. Progress in classification of higher taxa of the Cerambycidae. *Chinese Bulletin of Entomology*, 40(3): 211–217.]
- 华立中, 奈良一, Samuelson GA, Lingafelter SW, 2009. 中国天牛 (1406 种)彩色图鉴. 广州: 中山大学出版社. 1–50. [Hua LZ, Nai LY, Samuelson GA, Lingafelter SW, 2009. Iconography of Chinese longicorn beetles (1406 Species) in color. Guangzhou: Sun Yat-sen University Press. 1–50.]
- 蒋书楠, 陈力, 2001. 中国动物志 昆虫纲 第二十一卷 天牛科 花天牛亚科. 北京: 科学出版社. 1–33.[Jiang SN, Chen L, 2001. Animal Volunteers of China insecta the twenty-first volume *Cerambycidae Lepturinae*. Beijing : Science Press. 1–33.]
- 刘殿锋, 蒋国芳, 2005. 核基因序列在昆虫分子系统学上的应用. 动物分类学报, 30(3): 484–492. [Liu DF, Jiang GF, 2005. The application of nuclear genes sequences in insect molecular systematics. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 30(3): 484–492.]
- 苏丽娟, 张鸿飞, 徐卫, 尹新明, 李京, 高新浩, 2013. 四种天牛的核型比较研究. 昆虫学报, 56(3): 299–305. [Su LJ, Zhang HF, Xu W, Yin XM, Li J, Gao XH, 2013. A comparative study on karyotypes of four long-horned beetles (Coleoptera. Cerambycidae). *Acta Entomologica Sinica*, 56(3): 299–305.]
- 王乔, 1986. 天牛科昆虫的起源探讨. 西南农业大学学报, (3): 52–57.[Wang Q, 1986. The origin of the insect of *Cerambycidae*. *Journal of Southwest Agricultural University*, (3): 52–57.]
- 王文凯, 1999. 天牛总科雌性生殖器高级阶元分类. 西南农业大学学报, 21(5): 452–455. [Wang WK, 1999. Taxonomic study on the female reproductive organs of the higher taxa of the cerambycoidea (Coleoptera). *Journal of Southwest Agricultural University*, 21(5): 452–455.]
- 王文凯, 尹新明, 2002. 天牛总科高级分类阶元系统发育关系的研究. 河南农业大学学报, 36(1): 11–14. [Wang WK, Yin XM, 2002. Phylogenic relationships among the higher taxa of cerambycoidea. *Journal of Henan Agricultural University*. 36(1): 11–14.]
- 王哲, 景若芸, 乔格侠, 2013. 基于 DNA 条形码对桃属植物上蚜虫的快速鉴定. 应用昆虫学报, 50(1): 41–49. [Wang Z, Jing RY, Qiao GX, 2013. Rapid identification of aphids on amygdalus plants using DNA barcoding. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(1): 41–49.]
- 尹新明, 1999. 狭胸天牛分类地位初步研究(鞘翅目: 天牛总科). 昆虫分类学报, 21(4): 291–295.[Yi XM, 1999. Preliminary studies on classification status of Narrow chest longicorn(Coleoptera: Cerambycidae). *Entomotaxonomia*, 21(4): 291–295.]
- 张健, 李晓强, 刘斐, 任炳忠, 2010. 基于线粒体 16S rDNA 基因的天牛科部分种类分子系统学研究. 昆虫分类学报, 32(Suppl): 1–7. [Zhang J, Li XQ, Liu F, Ren BZ, 2010. Molecular phylogeny of partial longhorned beetles (Coleoptera: Cerambycidae) inferred from 16S rDNA sequences. *Entomotaxonomia*, 32(Suppl): 1–7.]
- 张健, 张晓军, 任炳忠, 2012. 基于 28S rDNA 基因的天牛科部分种类的分子系统发育. 林业科学, 48(10): 86–94. [Zhang J, Zhang XJ, Ren BZ, 2012. Molecular phylogeny of some longhorned beetles based on 28S rDNA sequences. *Scientia Silvae Sinicae*, 48(10): 86–94.]