应用昆虫学报 *Chinese Journal of Applied Entomology* 2015, 52(2): 370−381. DOI: 10.7679/j.issn.2095−1353.2015.041

墨天牛属昆虫 CO Ⅰ基因比较及系统学初步研究*

郑斯竹[1**] 张 凯[2***] 杨晓军[3] 徐 梅[3] 安榆林[3]

（1. 苏州出入境检验检疫局外来有害生物防控技术中心，苏州 215000；2. 上海共青森林公园，上海 200000；3. 江苏出入境检验检疫局，南京 210001）

摘 要 **【目的】** 对 11 种墨天牛线粒体 DNA 细胞色素氧化酶 C 亚基Ⅰ基因（COⅠ）进行比较并对墨天牛属系统发育关系进行初步探讨。**【方法】** 本文测定分析了 11 种墨天牛线粒体 DNA 细胞色素氧化酶 C 亚基Ⅰ基因（COⅠ），并采用简约法和贝叶斯推论法构建了墨天牛属的分子进化树。**【结果】** 序列比对分析得到 470 bp 大小的 COⅠ基因片段，其中可变异位点 169 个（36.0%），保守位点 301 个（64.0%），转换/颠换的平均值（*R* 值）为 1.03，说明此段序列适合于分子进化树。利用不同系统发育重建方法得到的进化树具有相似的拓扑结构，同时结合形态学分类特征对墨天牛属昆虫的分子系统进化关系进行探讨。结果显示分子结果与形态分类结果相似。**【结论】** 利用 COⅠ基因构建的墨天牛属系统发育树是探讨墨天牛分类的有效方法。

关键词 墨天牛属，线粒体 COⅠ基因，遗传距离，系统发育树

Sequence comparison and phylogenetic analysis of mtDNA CO I gene sequence fragments in *Monochamus* species (Coleoptera: Cerambycidae)

ZHENG Si-Zhu[1**] ZHANG Kai[2***] YANG Xiao-Jun[3] XU Mei[3] AN Yu-Lin[3]

(1. Laboratory for Prevention and Control of Alien Pests, Suzhou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Suzhou 215000, China; 2. Shanghai Gongqing Forest Park, Shanghai 200000, China; 3. Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001, China)

Abstract **[Objectives]** To determine the molecular phylogeny of *Monochamus* spp. by analyzing variation in mitochondrial COⅠgene sequences. **[Methods]** Mitochondrial COⅠgene sequences from 11 species were analyzed using MEGA 5.0. Phylogenetic trees for *Monochamus* were constructed using both the Parsimony (MP) and Bayesian-Inference (BI) methods. **[Result]** Sequence analysis results indicate that, after alignment, 470 sites consisted of 169 variable sites (36.0%) and 301 conserved sites (64.0%). The transition versus transversion ratio (*R*-value) was 1 .03. Saturation plots indicate that combined analysis had better a linear relationship than the single gene analysis, suggesting that base mutations have not reached saturation. Phylogenetic trees based on MP and BI methods had similar topologies, which was consistent with the results of the traditional morphology. Our results support the taxonomic validity of the genus *Monochamus*. **[Conclusion]** This study confirms that sequence analysis is an effective method for studying the taxonomy of *Monochamus*.

Key words *Monochamus*, mtDNACOⅠgene, genetic distance, phylogenetic tree

* 资助项目 Supported projects：国家“十二五”科技支撑计划项目 (2012BAK11B03)；国家质检总局科技计划项目(2014IK023)；江苏出入境检验检疫局科技项目(2013KJ55)；国家科技部公益项目（20111038）；江苏出入境检验检疫局科技项目（2014KJ44）

**第一作者 First author，E-mail：zhengsizhu@126.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：Zhangkai360973@163.com

收稿日期 Received：2014-11-24，接受日期 Accepted：2015-03-13

墨天牛属 *Monochamus* Guer 是沟胫天牛亚科中较大的一个属，也是经济意义重大的一个类群，其非中国种 *Monochamus* spp.（non-Chinese）已列入中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录（陈乃中，2009）。自 1826 年确立该属以来，全世界已记载 150 种，广泛分布于欧亚、非洲和北美（Breuning，1961；Forchhammer and Breuning，1986）。墨天牛属的寄主十分广泛，据不完全统计，其寄主涉及 59 个科属。在非洲区以非针叶树为主，偶或危害针叶树，如 *M. ruspator*。在其他分布区系，墨天牛以针叶树为主要寄主，同时又可对非针叶树造成危害。在东洋区的寄主有 25 个科属，涉及针叶树 6 个属；在古北区的寄主有 5 个科属，以针叶树为主；在新北区主要是针叶树，如松属 *Pinus*、云杉属 *Picea*、冷杉属 *Abies*、铁杉属 *Tsuga* 和黄杉属 *Pseudotsuga* 等。墨天牛对弱木、倒木、过火木甚至活树均可造成严重为害，其危害直接影响林木加工业。木材受其侵染后，成材率和使用率降低，极大地影响对外贸易量。

墨天牛作为天牛科中较古老类群，形态特征区分不明显，尤其是在幼虫上形态学极难区分，而国内外墨天牛属的研究又多数集中于形态学分类，有关该类群分子系统进化方面的研究少见报道。线粒体基因是一种进化速度较快的分子标记，其中 mtDNA COⅠ基因由于其分布的普遍性、序列和结构的相对保守性而被广泛应用于不同分类阶元的分子系统学研究。安榆林等（2004a，2004b）从 2000 年始就关注天牛的这一基因的独特作用，并应用该基因以区分光肩星天牛 *Monochamus alternatus* Hope 地理种群，证明了美国光肩星天牛与中国种群非同一种群，存在显著差异；2003 年起致力于研究该基因在天牛科遗传特点及种类鉴定方面应用的前景。Koutroumpa 等（2008）用线粒体基因中的 COⅠ基因和 28S 基因论证了欧洲两种重要墨天牛种类樟子松墨天牛 *M.galloprovincialis* 和云杉小墨天牛 *M. sutor* 间的关系。Kvamme 等（2012）用 COⅠ基因完成了近似种 *Stenostola ferrea* 和 *S. dubia* 间的区分鉴定。本研究通过墨天牛属昆虫 COⅠ基因编码区部分序列研究，从分子水平上讨论墨天牛属系统发育关系。为墨天牛属的系统发育研究提供基础依据。

1　材料与方法

1.1　供试虫源

本研究中 9 种墨天牛中成虫标本由江苏出入境检验检疫局植物检疫实验室鉴定和提供，其余 5 种 19 条墨天牛序列源自 NCBI，标本信息见表 1。

1.2　基因组 DNA 提取

本研究采用动物细胞组织/细胞基因组 DNA 磁珠提取试剂盒提取 DNA（北京，GenMagBio）。本研究使用标本包括无水乙醇浸泡保存的幼虫标本与干制成虫标本，剪取小于 30 mg 天牛肌肉组织，无水乙醇浸泡保存标本用无菌蒸馏水冲洗 4~5 次，弃水；干标本无菌蒸馏水浸泡 1~3 h 后吸干水分。置于 2 mL 离心管中，MM400 球磨仪中震荡碾磨（30 次/s）30 s，加入 180 μL Lysis Buffer、20 μL Proteinase K，震荡混匀，常温过夜，55℃震荡温浴 1~3 h。其余操作步骤按产品说明进行（郑斯竹，2012b）。

1.3　PCR 扩增及测序

为保证有效扩增，本研究采用巢氏 PCR（Nested PCR）扩增，第 1 轮引物依据天牛 COⅠ全长自行设计：上游引物 J173（5′-TAACAGCACATGCTTTTGTA-3′），下游引物 N1331（5′-GGATAGTCTGAGTATCGTCG-3′）（郑斯竹，2012a）；第 2 轮为鞘翅目昆虫通用引物（Loxdale and Lushai，1998），上游引物 J1718（5′-GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC-3′），下游引物 N2191（5′-CCCGGTAAAATT AAA ATA TAAACTTC-3′）。反应体系为 95℃预变性 5 min；进入循环，94℃ 30 s，第 1 轮引物退火温度为 55℃/第 2 轮引物退火温度 47℃ 30 s，72℃ 1 min（35 个循环）；72℃延伸 7 min（郑斯竹，2012）。扩增产物用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳进行检测，扩增结果良好的样品委托上海生工公司对样品

表 1 标本信息及序列登录号

Table 1 Specimens details and GenBank accession no.

种类 Species		虫态 Stage	产地 Location	GenBank accession no.
云杉粗鞘墨天牛	*Monochamus sartor* F.	成虫 Adult	土耳其 Turkey	KF247281
樟子松墨天牛	*M. galloprorincialis* (Germar)	成虫 Adult	俄罗斯 Russia	KF247278
密白点墨天牛	*M. impluviatus* Mot.	成虫 Adult	俄罗斯 Russia	KF247279
云杉花墨天牛	*M. saltuarius* Gebler	成虫 Adult	罗马尼亚 Romania	KF247280
云杉花墨天牛	*M. saltuarius* Gebler	幼虫 Larvae	台 湾 Taiwan	_
云杉花墨天牛	*M. saltuarius* Gebler	幼虫 Larvae	台 湾 Taiwan	_
云杉大墨天牛	*M. urussovi* (Fischer)	成虫 Adult	俄罗斯 Russia	KF247285
云杉小墨天牛	*M. sutor* L.	成虫 Adult	俄罗斯 Russia	KF247284
墨天牛属	*Monochamus* sp.	幼虫 Larvae	所罗门群岛 Solomon Island	KF247282
墨天牛属	*Monochamus* sp.	幼虫 Larvae	所罗门群岛 Solomon Island	KF247283
松墨天牛	*M. alternatus* Hope	成虫 Adult	中国（江苏） China (Jiangsu)	KF247277
云杉小墨天牛	*M. sutor* L.	_	From NCBI	DQ861321
麻斑墨天牛	*M. fascioguttatus* Gressitt	_	From NCBI	FJ559036
白点墨天牛	*M. scutellatus* Gressitt	_	From NCBI	KJ203745
白点墨天牛	*M. scutellatus* Gressitt	_	From NCBI	KJ202716
白点墨天牛	*M. scutellatus* Gressitt	_	From NCBI	KC593331
白点墨天牛	*M. scutellatus* Gressitt	_	From NCBI	KC593332
白点墨天牛	*M. scutellatus* Gressitt	_	From NCBI	KJ203133
松墨天牛	*M. alternates* Hope	_	From NCBI	JQ015147
松墨天牛	*M. alternates* Hope	_	From NCBI	JQ015146
松墨天牛	*M. alternates* Hope	_	From NCBI	JQ015145
松墨天牛	*M. alternates* Hope	_	From NCBI	JQ015144
松墨天牛	*M. alternatus* Hope	_	From NCBI	JQ015143
松墨天牛	*M. alternatus* Hope	_	From NCBI	JN087432
松墨天牛	*M. alternatus* Hope	_	From NCBI	JN087416
松墨天牛	*M. alternatus* Hope	_	From NCBI	JN087407
松墨天牛	*M. alternatus* Hope	_	From NCBI	GU003928
松墨天牛	*M. alternatus* Hope	_	From NCBI	FJ559001
松墨天牛	*M. alternatus* Hope	_	From NCBI	KF737828
蓝墨天牛	*M. guerryi* Pic	_	From NCBI	AB439140

进行正反双向测序。

1.4 实验数据处理

用 BioEdit 软件对测序获得的 DNA 序列进行峰值观察，测序结果导入 DNAStar 中的 SeqMan 软件（Parchman *et al.*，2010），进行手工拼接校正，确定无误的序列在 NCBI“ BLAST ”选项中（http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）

进行相似性检索。结果导入 Mega 5.0 软件（Kumar *et al.*，2008），计算各物种间的遗传距离、转换和颠换值及其比值（*R* 值）、保守位点（Conserved sites，*C*）及变异位点(Variable sites，*V*）等数值；同时，利用 Mega 5.0 构建简约法（Parsimony method，MP）系统树及利用 Bayesian 构建贝叶斯树(Simon *et al.*，1994)。

2　结果与分析

2.1　CO Ⅰ基因序列组成和变异

将测序及下载的序列合并导入 Mega 5.0 剪切成等长片段（470 bp），未发现有缺失和插入现象。变异位点为 169 个，保守位点 301 个，简约信息位点 118 个，自裔位点 51 个。所有位点中，A、G、C 和 T 碱基平均含量分别为 37.7%、17.0%、15.5%和 29.8%。A＋T 含量较高为 67.5%，明显高于 G＋C 含量，表现明显的 A＋T 碱基偏嗜，且 A 与 T 含量相当，符合昆虫线粒体基因碱基组成的基本特征。

2.2　碱基替换分析

使用 Mega 5.0 软件，计算全体位点及各位点的转换与颠换值以及其比值，结果如表 2 所示，全体位点的转换主要发生在 A 与 G 之间，颠换主要发生在 T 与 A 之间，密码子各位点分别分析，转换与颠换主要发生在密码子第 3 位点上，第一位点未有颠换与转换发生，且转换与颠换相当（0.93），符合昆虫线粒体的特征。转换／颠换平均值（*R* 值）为 1.03，转换值高于颠换值，表现出较为明显的转换饱和（表 3），说明在构建系统发育树时应考虑转换和颠换的发生比率，同时该段基因可靠度高，使用该基因得到的进化树可靠。

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的估算，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

表 2　墨天牛 CO Ⅰ基因碱基替换组成统计表

Table 2　The nucleotides substitution of CO Ⅰ gene for *Monochamus* sp.

	TT	TC	TA	TG	CT	CC	CA	CG	AT	AC	AA	AG	GT	GC	GA	GG
Avg	129.00	3.00	9.00	1.00	2.00	69.00	0.00	0.00	8.00	0.00	160.00	9.00	1.00	0.00	6.00	71.00
1st	23.00	0.00	0.00	0.00	0.00	26.00	0.00	0.00	0.00	0.00	65.00	0.00	0.00	0.00	0.00	42.00
2nd	43.00	0.00	0.00	0.00	0.00	42.00	0.00	0.00	0.00	0.00	36.00	3.00	0.00	0.00	4.00	27.00
3rd	63.00	2.00	8.00	1.00	2.00	0.00	0.00	0.00	8.00	0.00	59.00	6.00	1.00	0.00	3.00	2.00

表 3　墨天牛线粒体 CO Ⅰ基因遗传信息

Table 3　Nucleotide divergence patterns observed for the mtDNA CO Ⅰ gene for *Monochamus* sp.

	相同碱基值 Identical pairs	碱基转换值 Transitionsal pairs	碱基颠换值 Transversional pairs	转换/颠换比率(*R*)值 Transversion/ Transition	保守位点 Conserved sites	变异位点 Variable sites	简约位点 Parsimony informatic sites	碱基数 No. of characters
总序列 Total sequence	429.00	21.00	20.00	1.03	301.00	169.00	118.00	470.00
第 1 位点 First position	156.00	1.00	0.00	15.59	150.00	7.00	4.00	157.00
第 2 位点 Second position	149.00	8.00	1.00	6.31	117.00	40.00	27.00	157.00
第 3 位点 Third position	125.00	12.00	19.00	0.65	34.00	122.00	77.00	156.00

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的核苷酸替换数目。采用 Mega 5.0，基于 Kimura 2-parameter 模型分析 11 种墨天牛种群之间的遗传距离，将转换与颠换考虑在内，采用 Bootstrap 值（1 000 次进行检验，如表 4 所示，11 种墨天牛种内遗传距离介于 0~0.031，种内平均遗传距离为 0.011，种间的遗传距离介于 0.002~0.218，种间平均遗传距离为 0.122，种间平均遗传距离为种内平均遗传距离的 11.1 倍，各种群间的亲缘关系十分接近。其中来自土耳其的云杉粗鞘墨天牛 *Monochamus sartor* 与来自罗马尼亚的云杉花墨天牛 *M. saltuarius* 之间的遗传距离最小，为 0.002；来自所罗门群岛的 1 种墨天牛属幼虫 *Monochamus* sp.与蓝墨天牛 *M. guerryi* 之间的遗传距离最大，为 0.218。

2.4 系统发育树的构建

以沟胫天牛亚科黄蜡天牛 *Ceresium flavipes*（KF247264）、隆胸蜡天牛 *Ceresium sinicum ornaticolle*（KF247265）和中华蜡天牛 *Ceresium sinicum*（KF247266）作为外缘种群，利用 Mega 5.0 构建简约法（Parsimony method，MP）系统树及利用 Bayesian 构建贝叶斯树。

图 1 和图 2 中，松墨天牛 *Monochamus alternatus*、白点墨天牛 *M. scutellatus* 及云杉小墨天牛 *M. sutor* 不同地理种群稳定聚为一枝，来自台湾的云杉花墨天牛 *M. saltuarus* 成虫和幼虫聚为一枝，而来自土耳其的云杉粗鞘墨天牛 *M. sartor* 与来自罗马尼亚的云杉花墨天牛 *M. saltuarius* 稳定聚为一枝。总体分析，两种树中来自所罗门群岛的 2 种墨天牛幼虫都聚于系发育统树最外围，在 MP 系统发育树中松墨天牛 *M. alternatus* 和白点墨天牛 *M. scutellatus* 聚为一枝，云杉小墨天牛 *M. sutor*、云杉大墨天牛 *M. urussovi*、云杉粗鞘墨天牛 *M. sartor* 与云杉花墨天牛 *M. saltuarius* 聚为一枝，樟子松墨天牛 *M. galloprorincialis*、密白点墨天牛 *M. impluviatus*、麻斑墨天牛 *M. fascioguttatus* 与蓝墨天牛 *M. guerry* 聚为一枝。而在贝叶斯树中松墨天牛 *M. alternatus*、白点墨天牛 *M. scutellatus*、云杉小墨天牛 *M. sutor*、云杉大墨天牛 *M. urussovi*、云杉粗鞘墨天牛 *M. sartor* 与云杉花墨天牛 *M. saltuarius* 聚为一枝，樟子松墨天牛 *M. galloprorincialis*、密白点墨天牛 *M. impluviatus* 与蓝墨天牛 *M. guerry* 聚为一枝，麻斑墨天牛 *M. fascioguttatus* 单独一枝。

3 结论与讨论

本研究将自行测定的 11 条墨天牛 COⅠ序列进行拼接与手工校正，并进行“Blast”相似性检索，结果表明，此 11 条序列都属于墨天牛属 COⅠ序列且同源性均≥99%，说明此段序列准确性强、可信度高。

从遗传距离来看，11 种墨天牛种内遗传距离介于 0~0.031，种间的遗传距离介于 0.002~0.218，其中松墨天牛 *M. alternatus* 种间遗传距离为 0~0.031，说明该种群已产生较大的分化，其种内进化分歧已超过种间差异；来自土耳其的云杉粗鞘墨天牛 *M. sartor* 与来自罗马尼亚的云杉花墨天牛 *M. saltuarius* 之间的遗传距离为 0.002，远小于花墨天牛种内遗传距离，土耳其与罗马尼亚在地理上同处东欧，黑海沿岸，位置相临近，遗传距离的相近说明地理影响使两种墨天牛在进化上更加趋同；种内平均遗传距离 0.011，种间平均遗传距离为 0.122，种间平均遗传距离为种内平均遗传距离的 11.1 倍，各种群间的亲缘关系十分接近。

从分子系统发育树来看，MP 树和贝叶斯树中来自所罗门群岛的 2 种墨天牛都位于系统发育树的最外围，王乔（1988）研究认为墨天牛可能起源于非洲区，而后迁移到东洋区，本研究通过墨天牛 COⅠ基因构建的系统发育树与此推论符合；云杉小墨天牛 *M. sutor*、云杉大墨天牛 *M. urussovi*、云杉粗鞘墨天牛 *M. sartor* 与云杉花墨天牛 *M. saltuarius* 同属典型古北种，分布区域相似，在两种系统发育树中都聚为一枝，说明迁移路线有极大的相似性；作为古北种中向西分布最广的樟子松墨天牛 *M. galloprorincialis* 与东洋

表 4　基于 Kimura 2-parameter 模型墨天牛种间遗传距离

Table 4　Inter-species genetic distance of Aseminae species on Kimura 2-parameter

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
1																													
2	0.006																												
3	0.009	0.006																											
4	0.171	0.168	0.170																										
5	0.182	0.179	0.178	0.175																									
6	0.093	0.085	0.087	0.161	0.181																								
7	0.093	0.090	0.087	0.164	0.181	0.009																							
8	0.100	0.098	0.095	0.158	0.178	0.011	0.011																						
9	0.097	0.095	0.092	0.167	0.181	0.009	0.009	0.011																					
10	0.090	0.093	0.090	0.169	0.184	0.006	0.011	0.013	0.011																				
11	0.009	0.011	0.013	0.176	0.182	0.093	0.093	0.100	0.097	0.090																			
12	0.011	0.013	0.015	0.174	0.172	0.095	0.095	0.103	0.100	0.093	0.006																		
13	0.006	0.009	0.011	0.174	0.179	0.090	0.090	0.098	0.095	0.088	0.002	0.004																	
14	0.013	0.015	0.017	0.176	0.170	0.098	0.098	0.106	0.103	0.095	0.009	0.002	0.006																
15	0.179	0.176	0.179	0.222	0.254	0.197	0.197	0.197	0.194	0.200	0.179	0.182	0.176	0.185															
16	0.218	0.209	0.219	0.241	0.290	0.188	0.194	0.193	0.194	0.197	0.215	0.219	0.212	0.222	0.114														
17	0.172	0.163	0.166	0.167	0.244	0.171	0.182	0.179	0.179	0.179	0.172	0.176	0.169	0.179	0.127	0.151													
18	0.157	0.154	0.152	0.187	0.226	0.174	0.174	0.178	0.177	0.177	0.157	0.158	0.154	0.161	0.180	0.217	0.195												
19	0.081	0.078	0.081	0.156	0.183	0.066	0.075	0.078	0.073	0.068	0.081	0.084	0.078	0.086	0.179	0.191	0.136	0.169											
20	0.086	0.083	0.086	0.158	0.185	0.071	0.080	0.083	0.075	0.073	0.086	0.089	0.083	0.091	0.185	0.200	0.141	0.175	0.011										
21	0.091	0.088	0.090	0.167	0.195	0.075	0.085	0.087	0.082	0.078	0.091	0.093	0.088	0.096	0.185	0.197	0.144	0.175	0.009	0.019									
22	0.088	0.086	0.090	0.164	0.183	0.075	0.085	0.087	0.082	0.078	0.088	0.091	0.086	0.093	0.185	0.194	0.144	0.175	0.009	0.019	0.013								
23	0.081	0.078	0.081	0.156	0.186	0.066	0.075	0.078	0.073	0.068	0.081	0.084	0.078	0.086	0.176	0.188	0.136	0.166	0.004	0.015	0.009	0.009							
24	0.086	0.083	0.086	0.161	0.183	0.070	0.080	0.083	0.078	0.073	0.086	0.088	0.083	0.091	0.182	0.194	0.141	0.172	0.004	0.015	0.009	0.009	0.004						
25	0.088	0.086	0.088	0.161	0.195	0.078	0.088	0.090	0.085	0.080	0.088	0.091	0.086	0.093	0.188	0.201	0.147	0.172	0.011	0.022	0.015	0.015	0.011	0.011					
26	0.081	0.079	0.081	0.159	0.186	0.066	0.075	0.078	0.073	0.068	0.081	0.084	0.079	0.086	0.179	0.194	0.139	0.169	0.004	0.006	0.013	0.013	0.009	0.009	0.015				
27	0.081	0.079	0.081	0.159	0.186	0.066	0.075	0.078	0.073	0.068	0.081	0.084	0.079	0.086	0.179	0.194	0.139	0.169	0.004	0.006	0.013	0.013	0.009	0.009	0.015	0.000			
28	0.081	0.079	0.081	0.159	0.186	0.066	0.075	0.078	0.073	0.068	0.081	0.084	0.079	0.086	0.179	0.194	0.139	0.169	0.004	0.006	0.013	0.013	0.009	0.009	0.015	0.000	0.000		
29	0.083	0.081	0.083	0.159	0.186	0.068	0.078	0.080	0.075	0.070	0.083	0.086	0.081	0.088	0.179	0.191	0.138	0.169	0.002	0.013	0.006	0.006	0.002	0.002	0.009	0.006	0.006	0.006	
30	0.083	0.076	0.078	0.153	0.184	0.059	0.068	0.071	0.066	0.066	0.083	0.086	0.081	0.088	0.182	0.197	0.136	0.161	0.019	0.022	0.028	0.028	0.024	0.024	0.031	0.015	0.015	0.015	0.022

1:*Monochamus urussovi* (KF247285); 2: *M.sutor* (KF247285); 3:*M. sutor* (DQ861321); 4:*Monochamus* sp. (KF247282); 5: *Monochamus* sp. (KF247283); 6-10: *M.scutellatus*(KJ203745, KJ202716, KC593331, KC593332, KJ203133); 11 *M.surtor* (KF247284); 12-14:*M. saltuarius* (KF247280, Taiwan, Taiwan); 15: *M. impluviatus* (KF247279); 16: *M. guerryi* (AB439140); 17: *M. galloprovincialis* (KF247278); 18: *M. fascioguttatus* (FJ559036); 19-30: *M. alternates* (KF247277, JQ015143- JQ015147, KF737828, FJ559001, GU003928, JN087407, JN087416, JN087432).

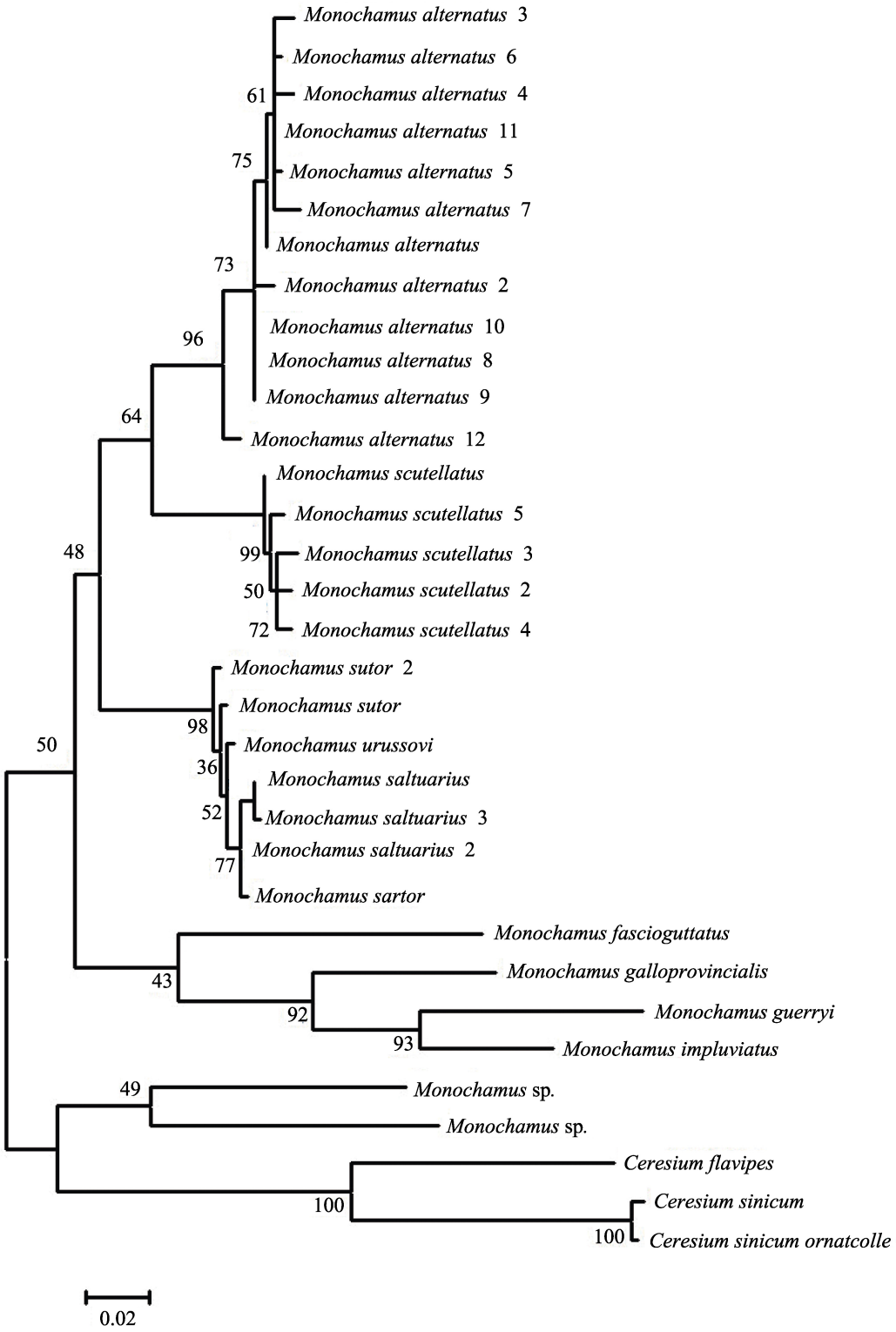

图 1　基于 CO Ⅰ 基因构建 12 种墨天牛的简约法系统发育树

Fig. 1　The MP (Parsimony method) tree for 12 species of *Monochamus* based on CO Ⅰ sequences

分支上数值示自展检验置信度，只给出大于 50%的置信度值。标尺示遗传距离。图 2 同。

The numbers at the nodes indicate the bootstrap values, and only values above 50% are given. Scale bar indicates the genetic distance. The same with Fig. 2.

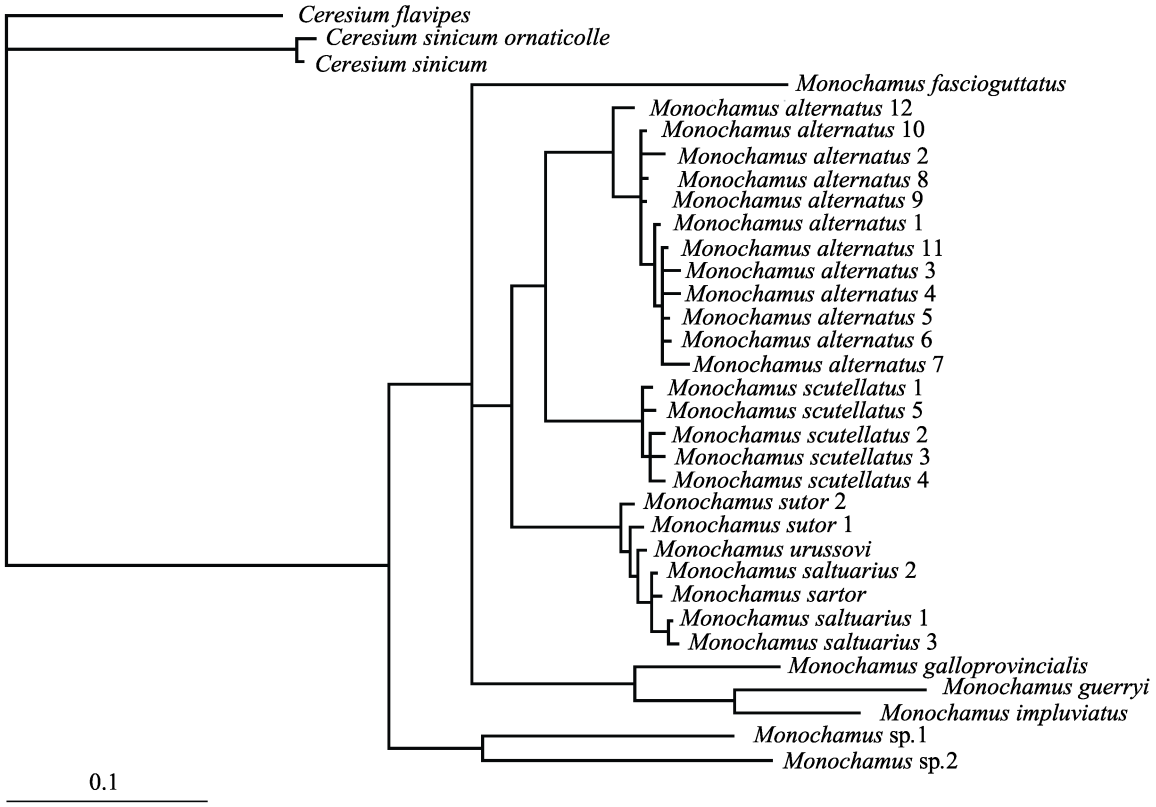

图 2　基于 CO Ⅰ基因构建 12 种墨天牛的贝叶斯树

Fig. 2　The Mrbayes tree for 12 species of *Monochamus* based on CO Ⅰ sequences

种蓝墨天牛 *M. guerry* 聚为一枝，位于古北种外围，进一步反映了古北种是由东洋区迁入。

从成虫形态上来看，不同来源的墨天牛形态差异明显。如来自东洋区的松墨天牛 *M. alternatus* 与来自古北区的云杉小墨天牛 *M. sutor*、云杉大墨天牛 *M. urussovi*、云杉粗鞘墨天牛 *M. sartor*、樟子松墨天牛 *M. galloprorincialis* 与云杉花墨天牛 *M. saltuarius* 这 5 种天牛在体色上差异显著，松墨天牛 *M. alternatus* 体赤褐色，触角红褐色；而来自古北区的 5 种天牛，其体色和触角均为黑色。在 MP 树和贝叶斯树中，来自新北区的白点墨天牛 *M. scutellatus* 与来自古北区的云杉小墨天牛 *M. sutor* 聚为一支，从其成虫形态上看，有相似性，尤其是雄虫，体上基本无毛斑，黑亮色，容易混淆。两者最大的区别是：云杉小墨天牛 *M. sutor* 的小盾片上光滑，中纵线从基部到端部完整（图 3：C），鞘翅刻点简单，刻点间平坦，每鞘翅无两条明显隆起的纵脊线，白点墨天牛 *M. scutellatus* 小盾片密布白色绒毛，仅在前端中央具一很短的，不明显的光滑中纵线（图 3：E），鞘翅刻点细密，越往翅端部约细，从鞘翅基部 1/4 起，每鞘翅具一条伸向端部的纵脊线。

在来自古北区的 5 种天牛中，云杉大墨天牛 *M. urussovi* 和云杉粗鞘墨天牛 *M. sartor* 鞘翅基部 1/3 处均有清晰的横压痕，小盾片有密集整齐的淡黄色绒毛（图 3：A，B）。而这两种在形态上区分有些含糊，在欧洲的墨天牛属害虫这篇文献中（朱军，2005），这两种的区别特征是鞘翅端部 1/4 有无密集明显的黄白色绒毛，刻点在翅端部是细密或分散粗糙（图 4）。这两个特征容易受鉴定者的主观判断影响，且雌雄虫鞘翅上的绒毛量一般不同，如果一种是雌虫标本，另一种是雄虫标本，那么判断就会有误。从遗传距离表来看，这两种遗传距离为 0.009，分子系统进化树同样表明此二者遗传关系相近，因此，在这两

种墨天牛的鉴定过程中，有必要探讨更合适的方法进行准确鉴定。

从幼虫形态上来看，墨天牛属幼虫头部极扁，口器前缘骨化程度，以及口上毛支数为分种特征，如云杉大墨天牛 *M. urussovi* 额前半部均为黑褐色，骨化程度高（图 5：A），而形态上与其相似的云杉小墨天牛 *M. sutor* 额前方的赤褐色骨化部分不到额长的 1/2，且界限不分明（图 4：B）；具有 3 节触角，第 3 节的形态及附属结构是分种的特征，如松墨天牛 *M. alternatus* 主

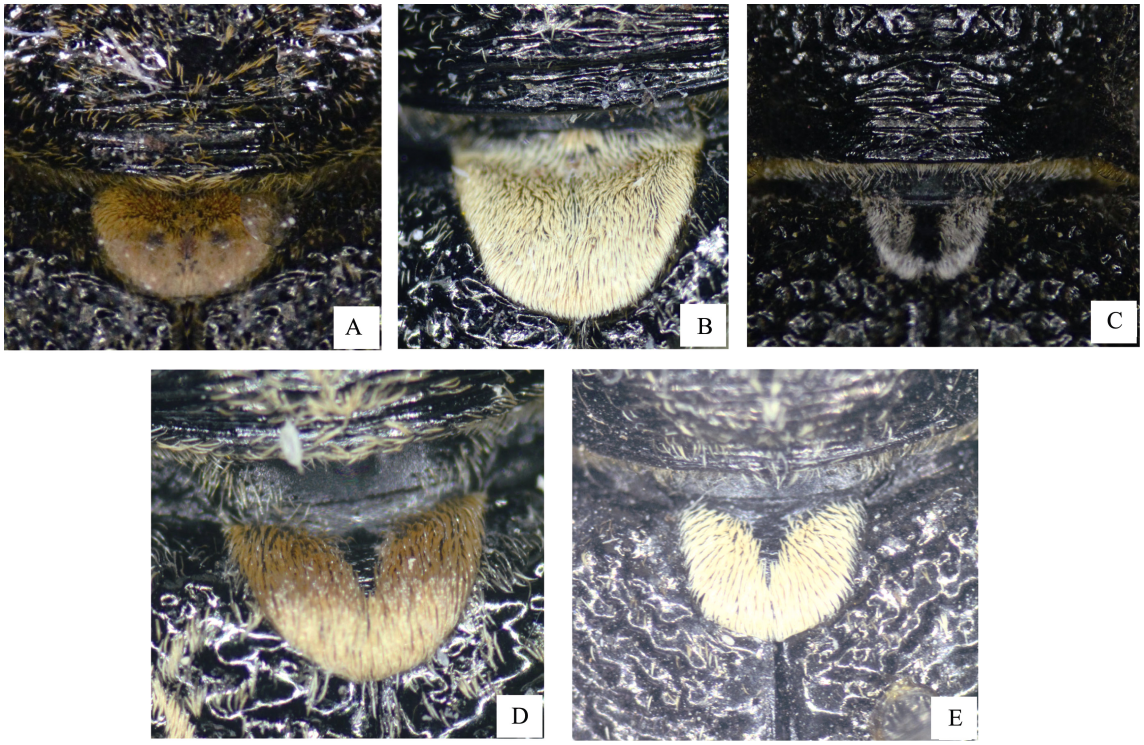

图 3　墨天牛属小盾片的特征比较

Fig. 3　Scutellums of *Monochamus* sp.

A. 云杉大墨天牛；B. 云杉粗鞘墨天牛；C. 云杉小墨天牛；D. 樟子松墨天牛；E. 密白点墨天牛。

A. *M. urussovi*; B. *M. sartor*; C. *M. sutor*; D. *M. galloprorincialis*; E. *M. impluviatus*.

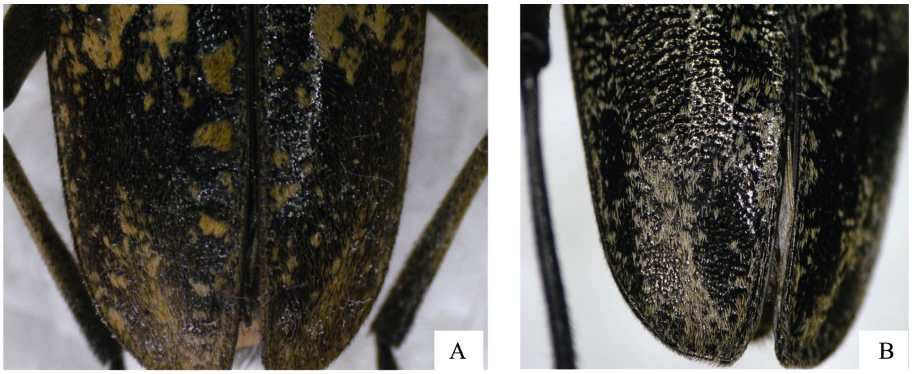

图 4　云杉大墨天牛与云杉粗鞘墨天牛鞘翅端部特征比较

Fig. 4　Apex of elytra of *Monochamus urussovi* and *Monochamus sartor*

A. 云杉大墨天牛；B. 云杉粗鞘墨天牛。

A. *M. urussovi*; B. *M. sartor*.

感器锥形，与第 3 节等长（图 6：A），而在 MP 树和贝叶斯树中与松墨天牛 *M. alternatus* 聚为一支的白点墨天牛 *M. scutellatus* 的主感器高于第 3 节（图 6：B）；前胸背板后区具有暗色细密微刺形成的凸形斑，背步泡突具 2 条明显的横沟，有 4 排念珠状瘤突，其瘤突的形态，是否愈合，其上有无细密褐刺是区分种类的特征，如樟子松墨天牛 *M. galloprorincialis* 的背步泡突念珠状明显，且光滑无黄色针刺（图 7：A），而其他几种天牛背步泡突或多或少愈合，且具有小而密的微刺（图 7：B，C，D）。这些分种特征差别细微，需借助高分辨率的解剖镜及精准的测量工具才能准确鉴别种类，且目前墨天牛属幼虫鉴定资料比较老旧零散，缺乏专业的鉴定人员，因此，急需寻找适合的方法，与传统形态分类相结合，以便更快速准确地进行种类区分鉴定。

本研究分析比较了 11 种墨天牛的线粒体 DNA 细胞色素氧化酶 C 亚基Ⅰ基因（CO Ⅰ），同时结合墨天牛形态学分类特征对墨天牛属昆虫的分子系统进化关系进行了初步分析。结果显示分子结果与形态分类结果相似，本段 CO Ⅰ基因可以为墨天牛属分类阶元关系提供依据。在下一步的研究中，应增加标本的数量，尤其是增加地理种群数量以增强分类单元的代表性，为墨天牛属分类提供更多的分子生物学证据。

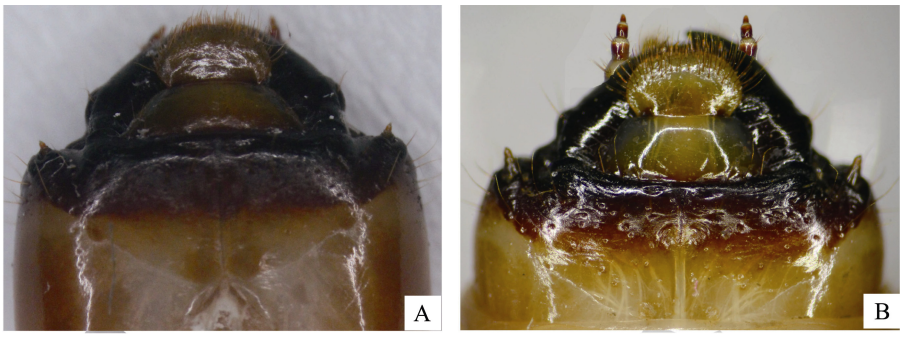

图 5　云杉大墨天牛幼虫与云杉小墨天牛幼虫口器特征比较

Fig. 5　Mouthparts of *Monochamus urussovi* and *Monochamus sartor* larvae

A. 云杉大墨天牛；B. 云杉小墨天牛。

A. *M. urussovi*; B. *M. sutor*.

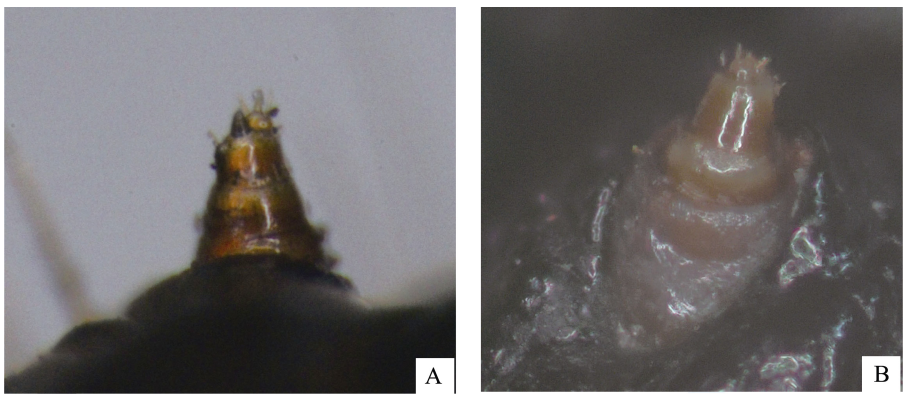

图 6　松墨天牛与白点墨天牛幼虫触角特征比较

Fig. 6　Antenna of *Monochamus alternates* and *Monochamus scutellatus* larvae

A. 松墨天牛；B. 白点墨天牛。

A. *M. alternates*; B. *M. scutellatus*.

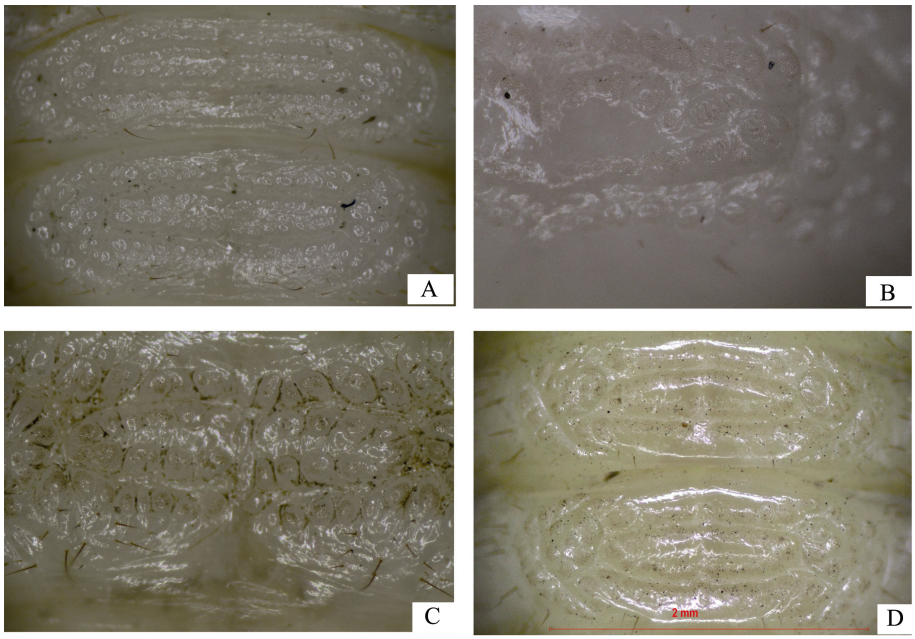

图 7 墨天牛幼虫的背步泡突特征比较

Fig. 7 Ambulatory ampullae of *Monochamus* sp.

A. 樟子松墨天牛；B. 云杉大墨天牛；C. 云杉小墨天牛；D. 松墨天牛。

A. *M. galloprorincialis*; B: *M. urussovi*; C. *M. sutor*; D. *M. alternates*.

参考文献 (References)

An YL, Huang XM, Yang XJ, Lin XJ, Ji BZ, Wang BD, Victor CM, 2004a. A study on mtDNA sequence and its genetic characteristics of *Anoplophora glabripennis* and its sibling specie. *Journal of Nanjing Forestry University* (*Natural Sciences Edition*), 28(4): 6–12. [安榆林, 黄晓明, 杨晓军,林晓佳,王保德, Mastro VC, 2004a. 光肩星天牛及其近缘种 mtDNA 序列和基因特点. 南京林业大学学报(自然科学版), 28(4): 6–12.]

An YL, Wang BD, Yang XJ, Lin XJ, Chen JD, Huang XM, Mastro VC, 2004b. Characterizing populations of *Anoplophora glabripennis* and related taxa with RAPD. *Acta Entomol. Sinica*, 47(2): 229–235. [安榆林, 王保德, 杨晓军,林晓佳,陈建东,黄晓明, Mastro VC , 2004b. 光肩星天牛种群间及其近缘种遗传关系的 RAPD 研究. 昆虫学报, 47(2): 229–235.]

Breuning S, 1961. Catalogue des Lamiaries du Monde // Frey G(ed.). Verlag des Museums. Tutzing bei München. 332–370.

Chen NZ, 2009. Quarantine Pests on Entry Plants in China. Beijing: China Agriculture Press. 355 –375. [陈乃中, 2009. 中国进境植物检疫性有害生物. 北京: 中国农业出版社. 355–375]

Felsenstein J, 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4): 783–791.

Forchhammer P, Breuning S, 1986. Annotated list of Cerambycidae, subfamily Lamiinae collected in Tanzania, Zambia and Botswana 1939-30 with description of 86 new taxa. *Nature Jutlandica*, 22(1): 1–72.

Koutroumpa FA, Rougon D, Bertheau C, Lieutier F, Roux-Morabito G, 2013. Evolutionary relationships within European *Monochamus* (Coleoptera: Cerambycidae) highlight the role of altitude in species delineation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 109(2): 354–376.

Kvamme T, Wallin H, Kvie KS, 2012. Taxonomy and DNA barcoding of *Stenostola ferrea* (Schrank, 1776) and *S. dubia* (Laicharting, 1784) (Coleoptera, Cerambycidae, Saperdini). *Norwegian Journal of Entomology*, 59: 78–87.

Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K, 2008. Mega: a biologist-centricsoftware for evolutionary analysis of DNA and protein sequence. *Brief Bioinform.*, 9(4): 299–306.

Koutroumpa FA, Lieutier F, Roux-Morabito G, 2008. Incorporation of mitochondrial fragments in the nuclear genome (Numts) of the longhorned beetle Monochamus galloprovincialis (Coleoptera Cerambycidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 47(2): 141–148.

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.

Loxdale HD, Lushai G, 1998. Molecular markers in entomological. *Bull. Entomol. Res.*, 88(6): 577–660.

Parchman TL, Geist KS, Grahnen JA, Benkman CW, Buerkle CA, 2010. Transcriptome sequencing in an ecologically important treespecies: assembly, annotation, and marker discovery. *BMC Genomics*, doi: 10.1186/1471-2164-11-180.

Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Floors P, 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Amer*., 87(6): 651–701.

Wang Q, 1988. The study about biogeography of *Monochamus* Guer. *Scientia Silvae Sinicae*, 24(3): 297–302. [王乔, 1988. 墨天牛属(*Monochamus* Guer)的生物地理学研究. 林业科学, 24(3): 297–302.]

Zheng SZ, 2012. A study on DNA barcoding and the molecular identification and detection methods of Cerambycidae. PhD Dissertation. Nanjing: Nanjing Forest University. [郑斯竹, 2012. 天牛科基因条形码构建及分子快速鉴定技术研究. 博士学位论文. 南京: 南京林业大学.]

Zheng SZ, AnYL, Xu M, Yang XJ, Chang H, Ji BZ, 2012a. The method of extraction trace DNA from Cerambycidae tissues which were preserved for many years. *Plant Quarantine*, 26(3): 30–34. [郑斯竹, 安榆林, 徐梅, 杨晓军,常虹,嵇保中 ,2012a. 多年保存天牛科标本的 DNA 微量提取方法. 植物检疫, 26(3): 30–34.]

Zheng SZ, An YL, Xu M, Yang XJ, Chang H, Ji BZ, 2012b. Comparative studies on DNA extraction and preservation of Monochamus alternatus larva specimens. *Journal of Central South University of Forestry and Technology*, 32(5): 144–148. [郑斯竹, 安榆林, 徐梅, 杨晓军, 常虹, 嵇保中, 2012b. 天牛幼虫保存与 DNA 提取方法比较研究. 中南林业科技大学学报, 32(5): 144–148.]

Zhu J, Liu Q, Wei JC, Zhang YH, Wu WW, 2005. The Monochamus pests of Europe. *Plant Quarantine*, 19(1): 35–37.[朱军, 刘强, 魏继承, 张韵涵, 吴蔚文. 2005. 欧洲的墨天牛属害虫.植物检疫, 19(1): 35–37.]