

基于内转录间隔区基因片段对叩甲科昆虫的系统发育研究*

孟子焯^{1**} 雷朝亮² 陈晓琴³ 江世宏^{3***}

(1. 贵州师范大学荞麦产业技术研究中心, 贵阳 550001; 2. 昆虫资源利用与害虫可持续治理湖北省重点实验室, 华中农业大学, 武汉 430070; 3. 深圳职业技术学院化生学院, 深圳 518055)

摘要 【目的】采用叩甲科昆虫的内转录间隔区 (ITS-2) 片段对叩甲科昆虫部分种类进行系统发育分析, 明确各亚科类群间的亲缘关系并同传统分类系统进行比较, 验证 ITS-2 片段是否能用于叩甲科昆虫的分子系统学研究。【方法】基于叩甲科昆虫的内转录间隔区 (ITS-2) 片段, 对 10 个亚科 69 个种类的叩甲进行了系统发育分析。进行系统发育信号检测, 计算各亚科之间的遗传距离, 采用邻接法、似然法和简约法三种模型构建系统发育树。【结果】3 种方法构建系统发育树结构基本一致, 各亚科都能被很好的聚类, 且各亚科间遗传距离符合传统分类学观点。同时, 分析结果也支持对传统分类系统进行修改: 尖鞘叩甲亚科 Oxynopterinae 和异角叩甲亚科 Pityobiinae 被聚入齿胸叩甲亚科 Denticollinae, 建议将尖鞘叩甲亚科和异角叩甲亚科同齿胸叩甲亚科合并; 槽缝叩甲亚科 Agrypninae 和单叶叩甲亚科 Conoderinae 并入萤叩甲亚科 Pyrophorinae; 梳爪叩甲类群 Melanotinae 被聚类到叩甲亚科 Elaterinae 内, 建议将梳爪叩甲亚科并入叩甲亚科。【结论】分析结果显示, ITS-2 片段适用于叩甲科昆虫低级分类阶元的系统发育分析, 各亚科之间的亲缘关系符合传统的分类学观点, 但聚类结果也有同传统分类系统有所不同, 可为分类系统的修改提供依据。

关键词 叩甲科, 内转录间隔区, 系统发育分析, 分类系统

Phylogenetic analysis of click beetles (Coleoptera: Elateridae) based on internal transcribed spacer-2 sequences

MENG Zi-Ye^{1**} LEI Chao-Liang² CHEN Xiao-Qin³ JIANG Shi-Hong^{3***}

(1. Research Center of Buckwheat Industry Technology, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China;

2. Key Laboratory of Insect Resources Utilization and Sustainable Pest Management of Hubei Province,

Institute of Insect Resources, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 3. College of Applied

Chemistry and Biotechnology, Shenzhen Polytechnic, Shenzhen 518055, China)

Abstract 【Objectives】To conduct phylogenetic analysis of the ITS-2 fragment of some click beetle (Elateridae) species to determine the genetic relationship among subfamilies, validate the traditional taxonomy, and verify whether the ITS-2 fragment is useful for molecular phylogenetic research on the Elateridae. 【Methods】Phylogenetic analysis of the ITS-2 fragment of 69 species of 10 Elateridae subfamilies was conducted. Phylogenetic signal detection was carried out to calculate the genetic distance between subfamilies, and phylogenetic trees were constructed using the adjacency, likelihood, and parsimony, methods. 【Results】Trees constructed by all three methods were basically the same, subfamilies were all clearly clustered, and the genetic distances between subfamilies were in accordance with the traditional taxonomy. However, the results also support modifications of the traditional taxonomy, specifically merging the Oxynopterinae and Pityobiinae with the

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金面上项目 (31372231); 贵州师范大学资助博士科研项目

**第一作者 First author, E-mail: ziyemeng@outlook.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: sjiang@szpt.edu.cn

收稿日期 Received: 2017-05-23, 接受日期 Accepted: 2017-09-05

Denticollinae, the Agrypninae and Conoderinae with the Pyrophorinae, and the Melanotinae with the Elaterinae. [Conclusion] The results show that the ITS-2 fragment is suitable for low-level classification of the Elaterinae and the phylogenetic relationships among subfamilies accords with the traditional taxonomy. However, the clustering results differ from the traditional taxonomy and provide a basis for revising the taxonomy of this group.

Key words Elateridae, internal transcribed spacer, phylogenetic, classification system

叩甲科 (Elateridae) 隶属于鞘翅目 (Coleoptera), 叩甲总科 (Elateroidea), 是叩甲总科中种类和数量最多的一个科。叩甲的幼虫通称金针虫, 取食植物的根和块茎, 是一种重要的地下害虫 (江世宏和王书永, 1999)。

从 Linnaeus 记述叩甲科开始, 叩甲科的分类系统在很长一段时期里都有非常大的变动, 一直到今天都有着争议。基于传统形态特征的分类学研究更多的是需要依靠研究者本身的经验和判断, 而叩甲科是最难鉴定的昆虫之一 (Sagegami-Oba *et al.*, 2007), 很多种类的形态差异非常小, 极大的提高了叩甲分类学研究的难度。随着分子生物学技术的成熟和普及, 近些年的叩甲科分类及系统学研究都基于分子标记来展开。Bocakowa 等 (2007) 基于 28S rDNA 和 18S rDNA 对 Elateriformia 类群 (包括叩甲、吉丁和萤火虫) 进行系统发育分析, 从发光性和幼体发育等方面对 Elateriformia 类群的进化关系进行了讨论。Kundrata 和 Bocak (2011) 基于 28S rDNA, 18S rDNA, *rnl* 和 *cox1* 片段, 对叩甲总科类群构建系统发育树, 探讨其进化历程, 同时对叩甲科的分类系统进行了修改和讨论。Timmermans 和 Vogler (2012) 利用线粒体基因组对叩甲总科类群进行系统发育分析, 对各科的单系性进行了验证。

内转录间隔区 ITS (Internal transcribed spacer) 是核糖体 DNA (Ribosomal DNA, rDNA) 的转录单元, 被 5.8S rDNA 分隔为 ITS-1 和 ITS-2 两段, 全长约 1.0~1.5 kb, 其转录产物在形成 rRNA 之前被剪切掉, 不参与核糖体的形成, 因此, 受到的选择压力小, 进化速度快。ITS-2 序列在种内相对保守, 而在种间具有一定差异, 被认为适合一些从形态上难以鉴定的种类的研究。目前应用较多的是利用 ITS-2 进行近缘种的鉴定和种群间分化程度的研究, ITS-1 在上述领域也

有一定的应用, 而基于 ITS 序列对叩甲科昆虫的系统发育研究还没有相应报道。

1 材料与方法

1.1 叩甲科标本采集

2006 年 6 月—2010 年 6 月在广东, 广西, 云南, 湖北等地进行采集, 样本采集记录后放入无水乙醇中保存。

1.2 基因组提取

总基因组的提取主要参考田英芳等 (1999) 及代金霞等 (2004) 的基因组 DNA 提取方法。选取样本的后足腿节肌肉进行基因组 DNA 的提取。对于心盾叩甲亚科和小叩甲亚科的一些种类, 因为体型较小, 使用 TIANGEN 公司的微量样品基因组 DNA 提取试剂盒。

1.3 ITS-2 片段的扩增和测序

叩甲科 ITS-2 片段扩增所用引物为正向引物 5'-TGTGAAGTGCAGGACACAT-3' 和反向引物 5'-TATGCTTAAATTCAGGGGGT-3' (Beebe and Saul, 1995)。PCR 反应体系为 25 μ L, 体系配置如下: 14.5 μ L ddH₂O, 2.5 μ L PCR Buffer (Mg²⁺ free), 2 μ L MgCl₂ (25 mmol·L⁻¹), 2 μ L dNTP, 1 μ L Primer F/R, 2 μ L 模板 DNA, 0.2 μ L Taq 聚合酶。PCR 反应程序为: 95 预变性 4 min, 95°C 变性 30 s, 55 退火 1 min, 72 延伸 2 min (循环 35 次)。反应结束后 72 延伸 10 min。PCR 产物的测序由英潍捷基 (上海) 生物技术有限公司和南京金斯瑞生物技术有限公司完成。

1.4 系统发育分析

测序完成后采用 ClustalX2.0 和 MAFFT v6.864 软件进行多重序列比对, 序列比对后采用

MEGA 5.05 和 PAUP* 4beta10 软件进行发育信号的检测和系统发育分析。系统发育树的构建采用邻接法 (Neighbor-Joining method, NJ), 最大似然法 (Maximum Likelihood method, ML), 最大简约法 (Maximum Parsimony method, MP)。NJ 法构建系统发育树时, 根据碱基组成偏向性的不同采用距离模型, 关闭分子钟假设, 删除碱基空位和缺失, 自举检验为 1 000 次。ML 法构建系统发育树需选择合适的进化模型, 利用 modeltest 3.7 软件分别计算 56 个模型各自的 BIC (Bayesian information criterion), AICc (Akaike information criterion, corrected) 和 Maximum Likelihood 值, BIC 分数最低的模型为最佳模型。参考计算出的最佳模型参数进行设置, 自举检验设置为重

复 1 000 次, 删除碱基的空位和缺失, 采用近邻交换法 (Close-neighbor-interchange, CNI) 搜索并自动生成起始树, 进行启发式搜索。MP 法设置为最小启发式搜索 (Min-mini heuristic), 自举检验重复 1 000 次。

2 结果与分析

2.1 ITS-2 基因序列组成分析

本研究共获得叩甲 10 亚科 37 属 69 种昆虫的 ITS-2 基因序列, 其中包括 11 种叩甲不同地理种群的 ITS-2 序列, 得到 ITS-2 片段共 80 条, 扩增种类及采集地点见表 1。

测序所得 ITS-2 基因扩增片段最短为 404 bp,

表 1 ITS-2 片段扩增样品及 GenBank 的序列编号
Table 1 List of taxa based on 28S rDNA and accession numbers in GenBank

叩甲种类 Taxa	GenBank 检索号 Accession No.	采集地点 Collection location
Oxynopterinae 尖鞘叩甲亚科		
<i>Ceropectus messi</i> (Candèze, 1874)	KC311769	浙江西天目振布 Mt. Tianmu, Zhenbu, Zhenjiang
<i>Campsosternus auratus</i> (Drury, 1773)	KC311766	广东深圳梧桐山 Mt. Wutong, Shenzhen, Guangdong,
<i>Campsosternus auratus</i> (Drury, 1773)	KC311767	广东南岭 Mt. Nanling, Guangdong
<i>Campsosternus fruhstorferi</i> Schwarz	KC311768	广西金秀桐木镇 Guangxi, Jinxiu, Tongmu Town
Agrypninae 槽缝叩甲亚科		
<i>Agrypnus musculus</i> (Candèze, 1857)	MF180137	四川乐山马边 Sichuan, Leshan, Mabian
<i>Agrypnus kawamurae</i> (Miwa, 1929)	MF180136	海南五指山 Hainan, Mt. Wuzhi
<i>Agrypnus bipapulatus</i> (Candèze, 1865)	MF180135	广西临桂黄沙 Guangxi, Lingui, Huangsha Town
Pyrophorinae 萤叩甲亚科		
<i>Lacon rotundicollis</i> Kishii et Jiang	MF180154	广西桂林冷水塘 Guangxi, Guilin, Lengshuitang Town
<i>Lacon</i> sp.	MF180155	云南怒江州六库鲁掌 Yunnan, Nujiang, Luzhang Town
<i>Tetralobus perroti</i> Fleutiaux	MF180187	广东南岭 Guangdong, Mt. Nanling
<i>Alaus sculptus</i> Westwood	MF180138	广东南岭 Guangdong, Mt. Nanling
<i>Adelocera tumens</i> (Candèze, 1873)	MF180130	广西猫儿山 Guangxi, Mt. Mao'er
<i>Adelocera</i> sp.	MF180129	广东南岭 Guangdong, Mt. Wutong
<i>Cryptalaus larvatus</i> (Candèze, 1874)	MF180148	广西十万大山 Guangxi, Mt. Shiwan
<i>Cryptalaus larvatus</i> (Candèze, 1874)	MF180149	湖北罗田县圣人堂 Hubei, Luotian, Shengrentang Town
<i>Cryptalaus berus</i> (Candèze, 1865)	MF180147	广西金秀桐木镇 Guangxi, Jinxiu, Tongmu Town
<i>Cryptalaus sordidus</i> (Westwood, 1848)	MF180150	浙江西天目振布 Zhenjiang, Zhenbu, Mt. Tianmu

续表 1 (Table 1 continued)

叩甲种类 Taxa	GenBank 检索号 Accession No.	采集地点 Collection location
<i>Cryptalaus sordidus</i> (Westwood, 1848)	MF180151	广西金秀花山 Guangxi, Jinxiu, Mt. Hua
<i>Tetrigus lewisi</i> Candèze	MF180188	湖北广水 Hubei, Guangshui
<i>Tetrigus lewisi</i> Candèze	MF180189	湖北神农架 Hubei, Shennongjia
Conoderinae 单叶叩甲亚科		
<i>Aeoloderma brachmana</i> (Candèze, 1859)	MF180131	湖北神农架 Hubei, Shennongjia
Pityobiinae 异角叩甲亚科		
<i>Pectocera fortunei</i> Candèze	KC311771	贵州贵阳黔灵公园 Guizhou, Guiyang, Mt. Qianling
Denticollinae 齿胸叩甲亚科		
<i>Athousius wudanganus</i> Kishii et Jiang	KC311772	湖北神农架 Hubei, Shennongjia
<i>Penia</i> sp.	KC311775	四川雅安宝兴县蜂涌寨 Sichuan, Ya'an, Baoxing, Fengtongzhai Town
<i>Hemicrepidius</i> sp.	KC311774	广西十万大山 Guangxi, Mt. Shiwan
<i>Selatosomus aeneomicans</i> (Fairmaire, 1889)	KC311777	四川雅安宝兴县陇东 Sichuan, Ya'an, Baoxing, Longdong Town
<i>Selatosomus gravidus</i> (Germar, 1843)	KC311778	广东南岭 Guangdong, Mt. Wutong
<i>Selatosomus gravidus</i> (Germar, 1843)	KC311779	广西猫儿山 Guangxi, Mt. Mao'er
<i>Hemicrepidius guizhouensis</i> Kishii et Jiang	KC311773	广西猫儿山 Guangxi, Mt. Mao'er
<i>Senodonia sculpticollis</i> (Fairmaire, 1888)	KC311780	广西桂林华江 Guangxi, Guilin, Huajiang Town
<i>Senodonia</i> sp.	KC311781	云南丽江文笔山 Yunnan, Lijiang, Mt. Wenbi
<i>Pristilophus</i> sp.	KC311776	广东深圳梧桐山 Guangdong, Shenzhen, Mt. Wutong
Elaterinae 叩甲亚科		
<i>Ampedini nigrinus</i> (Herbst, 1784)	MF180139	四川峨边黑竹沟 Sichuan, Ebian, Mt. Heizhugou
<i>Megapenthes hummeli</i> Fleutiaux	MF180156	湖北神农架 Hubei, Shennongjia
<i>Megapenthes insignitus</i> Lewis	MF180157	广西猫儿山 Guangxi, Mt. Mao'er
<i>Gamepenthes versipellis</i> (Lewis, 1894)	MF180152	广西临桂黄沙 Guangxi, Lingui, Huangsha Town
<i>Prokraerus</i> sp.	MF180179	广东南岭 Guangdong, Mt. Wutong
<i>Prokraerus ligatus</i> (Candèze, 1878)	MF180178	广西十万大山 Guangxi, Mt. Shiwan
<i>Xanthopenthes granulipennis</i> (Miwa, 1929)	MF180190	贵州梵净山盘溪 Guizhou, Mt. Fanjing, Panxi Town
<i>Xanthopenthes granulipennis</i> (Miwa, 1929)	MF180191	湖北武汉狮子山 Hubei, Wuhan, Mt. Shizi
<i>Glyphonyx longipennis</i> Ôhira	MF180153	四川雅安宝兴县硃磬乡 Sichuan, Ya'an, Baoxing, Qiaoqi Town
<i>Silesis modestus</i> Candèze	MF180184	云南大理苍山 Yunnan, Dali, Mt. Cangshan
<i>Silesis rufipes</i> Candèze	MF180186	广西金秀老山 Guangxi, Jinxiu, Mt. Laoshan
<i>Silesis absimilis</i> Candèze	MF180182	四川雅安宝兴县蜂涌寨 Sichuan, Ya'an, Baoxing, Fengtongzhai Town
<i>Silesis duporti</i> Fleutiaux	MF180183	四川雅安宝兴县蜂涌寨 Sichuan, Ya'an, Baoxing, Fengtongzhai Town
<i>Silesis okinawensis</i> Miwa	MF180185	广西猫儿山 Guangxi, Mt. Mao'er

续表 1 (Table 1 continued)

叩甲种类 Taxa	GenBank 检索号 Accession No.	采集地点 Collection location
<i>Parasilesis sauteri</i> (Miwa, 1930)	MF180172	四川雅安宝兴县蜂涌寨 Sichuan, Ya'an, Baoxing, Fengtongzhai Town
<i>Agriotes subvittatus</i> Motschulsky	MF180132	云南大理巍宝山 Yunan, Dali, Mt. Weibao
<i>Agriotes toukinesis</i> (Fleutiaux, 1894)	MF180133	广西上思县老山 Guangxi, Shangsi, Mt. Laoshan
<i>Agriotes toukinesis</i> (Fleutiaux, 1894)	MF180134	云南怒江分水岭 Yunan, Nujiang, Fenshuiling Town
<i>Chiagosnius vittiger</i> (Heyden, 1887)	MF180147	云南丽江文笔山 Yunnan, Lijiang, Mt. Wenbi
<i>Chiagosnius obscuripes</i> (Gyllenhal, 1817)	MF180146	广西桂林高寨 Guangxi, Guilin, Gaozhai Town
<i>Aphanobius alaomorphus</i> Candèze	MF180140	四川雅安宝兴县硃磧乡 Sichuan, Ya'an, Baoxing, Qiaoqi Town
<i>Aphanobius alaomorphus</i> Candèze	MF180141	四川雅安宝兴县陇东 Sichuan, Ya'an, Baoxing, Longdong Town
Melanotinae 梳爪叩甲亚科		
<i>Melanotus arctus</i> Candèze	MF180158	广东南岭 Guangdong, Mt. Wutong
<i>Melanotus cribricollis</i> (Faldermann, 1835)	MF180159	广东南岭 Guangdong, Mt. Wutong
<i>Melanotus frequens</i> (Miwa, 1930)	MF180160	广西猫儿山 Guangxi, Mt. Mao'er
<i>Melanotus hourai</i> Kishii	MF180161	贵州梵净山盘溪 Guizhou, Mt. Fanjing, Panxi Town
<i>Melanotus lameyi</i> Fleutiaux	MF180162	广西金秀桐木镇 Guangxi, Jinxiu, Tongmu Town
<i>Melanotus lameyi</i> Fleutiaux	MF180163	广东南岭 Guangdong, Mt. Wutong
<i>Melanotus nuceus</i> Candèze	MF180165	四川雅安宝兴县硃磧乡 Sichuan, Ya'an, Baoxing, Qiaoqi Town
<i>Melanotus propexus</i> (Candèze, 1860)	MF180166	广东南岭 Guangdong, Mt. Wutong
<i>Melanotus splendidus</i> Platia et Schimmel	MF180168	湖北神农架 Hubei, Shennongjia
<i>Melanotus tamsuyensis</i> Bates	MF180169	浙江西天目振布 Zhenjiang, Zhenbu, Mt. Tianmu
<i>Melanotus venalis</i> Candèze	MF180170	湖北神农架 Hubei, Shennongjia
<i>Melanotus</i> sp.	MF180167	广东南岭 Guangdong, Mt. Wutong
<i>Melanotus melli</i> Platia et Schimmel	MF180164	广东肇庆黑石顶 Guangdong, Zhaoqing, Mt. Heishiding
<i>Priopus angulatus</i> (Candèze, 1860)	MF180177	广东南岭 Guangdong, Mt. Wutong
Negastriinae 微叩甲亚科		
<i>Quasimus</i> sp.	MF180181	云南大理苍山 Yunnan, Dali, Mt. Cangshan
<i>Quasimus shaxianensis</i> Jiang	MF180180	云南丽江文笔山 Yunnan, Lijiang, Mt. Wenbi
Cardiophorinae 心盾叩甲亚科		
<i>Cardiophorus sonani</i> Miwa	MF180142	四川雅安宝兴县硃磧乡 Sichuan, Ya'an, Baoxing, Qiaoqi Town
<i>Cardiotarsus humeralis</i> Miwa	MF180143	湖北神农架 Hubei, Shennongjia
<i>Cardiotarsus humeralis</i> Miwa	MF180144	广西上思县老山 Guangxi, Shangsi, Mt. Laoshan
<i>Paracardiophorus</i> sp.	MF180171	广西金秀花王山 Guangxi, Jinxiu, Mt. Huawang
<i>Platynychus nothus</i> (Candèze, 1865)	MF180175	广西金秀桐木镇 Guangxi, Jinxiu, Tongmu Town
<i>Platynychus nothus</i> (Candèze, 1865)	MF180176	广东肇庆黑石顶 Guangdong, Zhaoqing, Mt. Heishiding
<i>Phorocardius comptus</i> (Ohira, 1978)	MF180173	云南大理苍山 Yunnan, Dali, Mt. Cangshan
<i>Phorocardius unguicularis</i> (Fleutiaux, 1931)	MF180174	广西桂林花山 Guangxi, Guilin, Mt. Hua

最长为 727 bp, 将测序后所得的 ITS-2 序列编辑为 FASTA 格式文件, 导入比对软件进行序列比对。使用 MEGA 5.05 软件对对比结果进行序列特征分析。

2.2 ITS-2 区序列碱基组成

扩增的共 80 条叩甲的 ITS-2 区序列, 其中含有保守位点 18 个, 变异位点 562 个, 简约信息位点 523 个、自裔位点 29 个。碱基平均百分含量 T、C、A、G 分别为 18.9%、31.1%、17.0%、33.0%。两两碱基转换颠换比 $R = \text{转换} / \text{颠换} = 1.51$, 转换大于颠换。

2.3 ITS-2 基因序列遗传距离

使用 MEGA5.05 软件计算叩甲各亚科 ITS-2 基因序列之间的遗传距离, 叩甲各亚科内未校正遗传距离 (p-distance) 结果见图 1。

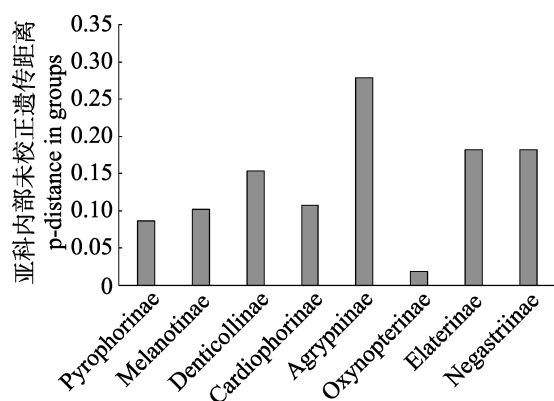


图 1 基于 ITS-2 序列 8 亚科内部遗传距离

Fig. 1 Genetic distances based on ITS-2 sequences within 8 groups

基于 ITS-2 片段对叩甲各亚科内遗传距离进行分析, 尖鞘叩甲亚科内类群遗传距离最小, 平均遗传距离为 0.0182; 梳爪叩甲亚科内部遗传距离为 0.1015; 齿胸叩甲亚科内遗传距离为 0.1534; 心盾叩甲亚科内遗传距离为 0.1076; 萤叩甲亚科内遗传距离为 0.0865; 叩甲亚科与小叩甲亚科内部遗传距离均为 0.1818; 槽缝叩甲亚科内遗传距离最大, 为 0.2788。

2.4 叩甲科各亚科系统发育分析

2.4.1 尖鞘叩甲亚科、异角叩甲亚科、胖叩甲亚科与齿胸叩甲亚科的系统发育分析

从 ITS-2 区基因序列组成来看, 尖鞘叩甲亚

科 Oxynopterinae 的 GC 百分含量最低为 59.0%, 最高为 62.1%, 平均为 61.1%。齿胸叩甲亚科 Denticollinae 的 GC 百分含量最低为 61.2%, 最高为 65.9%, 平均为 63.6%。

基于用尖鞘叩甲亚科, 异角叩甲亚科, 齿胸叩甲亚科共 14 种的 ITS-2 基因片段, 分别采用 Tamura 3-parameter 模型构建 NJ 树, 采用 T92+I 模型构建 ML 树和采用 CNI 法构建 MP 树。

如图 2 所示, NJ 树分为 3 个分支, 第一分支中异角叩甲亚科聚入尖鞘叩甲亚科内部, 其余两分支均为齿胸叩甲亚科类群, 方胸叩甲属 *Senodoniini* 处于系统树的基部。ML 树同 NJ 树在结构的差异在于尖鞘叩甲类群没有聚类为单系群, 而 MP 树聚类结果同 NJ 树相同。

2.4.2 槽缝叩甲亚科, 单叶叩甲亚科与萤叩甲亚科的系统发育分析

从 ITS-2 区基因序列组成来看, 槽缝叩甲亚科 Agrypninae 的 GC 百分含量最小为 65.7%, 最高为 68.0%, 平均为 67.2%。单叶叩甲亚科 Conoderinae 的 GC 百分含量最小为 62.8%, 最高为 66.0%, 平均为 65.1%。萤叩甲亚科 Pyrophorinae 的 GC 百分含量最小为 62.2%, 最高为 66.2%, 平均为 65.0%。

基于 3 亚科的 ITS-2 序列片段构建系统发育树, 其中 NJ 树采用 Tamura 3-parameter 距离模型, ML 树使用 GTR+G+I 模型, MP 树为 CNI 法。

图 3 所示, NJ 树槽缝叩甲亚科和单叶叩甲亚科被聚入萤叩甲亚科中, 巨四叶叩甲 *Tetralobus perroti* (Fleutiaux, 1940) 单独一支, 其余种类聚类成为一簇, 槽缝叩甲亚科没有表现出单系性。ML 树同 NJ 树相比, 暗色槽缝叩甲 *Agrypnus musculus* (Candèze, 1857) 的位置有所不同, 并且槽缝叩甲亚科呈现为单系群, 而 MP 树同 ML 树结构一致。

2.4.3 叩甲亚科与梳爪叩甲亚科的系统发育分析

从 ITS-2 区基因序列组成来看, 叩甲亚科 Elaterinae 的 GC 百分含量最低为 54.1%, 最高为 67.7%, 平均为 63.6%。梳爪叩甲亚科 Melanotinae 的 GC 百分含量最低为 56.1%, 最高为 65.6%, 平均为 60.3%。

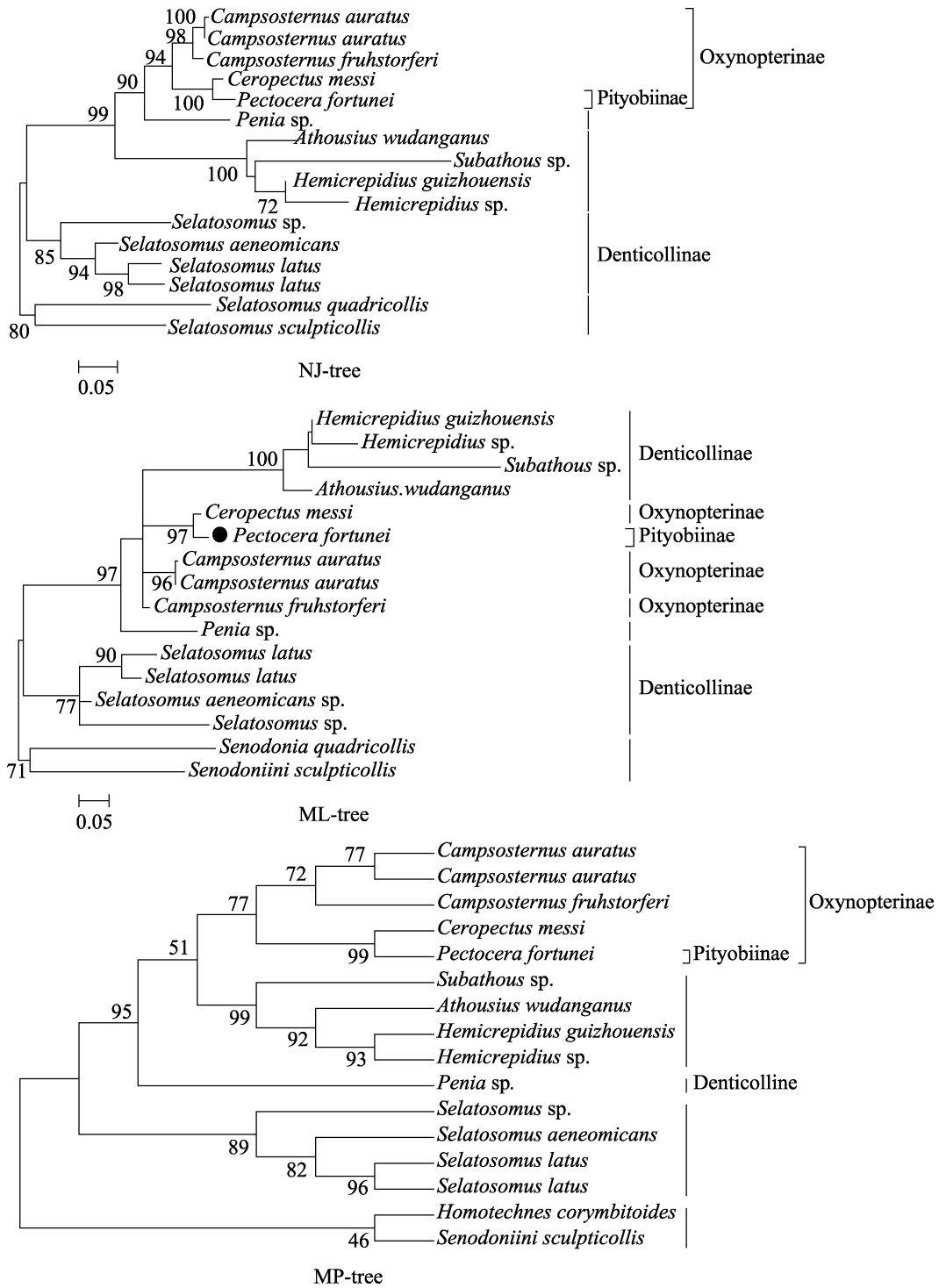


图 2 尖鞘叩甲亚科、异角叩甲亚科、胖叩甲亚科与齿胸叩甲亚科各类群 ITS-2 片段基于邻接法, 最大似然法和最大简约法构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic trees constructed through Neighbor-Joining method, Maximum Likelihood method and Maximum Parsimony method based on ITS-2 sequences of Oxynopterinae, Pityobiinae, Hypnoidinae and Denticollinae

基于叩甲亚科与梳爪叩甲亚科各类群 ITS-2 片段构建系统发育树, NJ 树使用 Tamura 3-parameter 模型, ML 树采用 K2+G 模型, MP 树采用 CNI 法。

图 4 为 3 种方法构建的系统发育树。结果显示, NJ 树中, 梳爪叩甲亚科被聚入到叩甲亚科内, 梳爪叩甲属 *Melanotus* 表现为单系性。ML

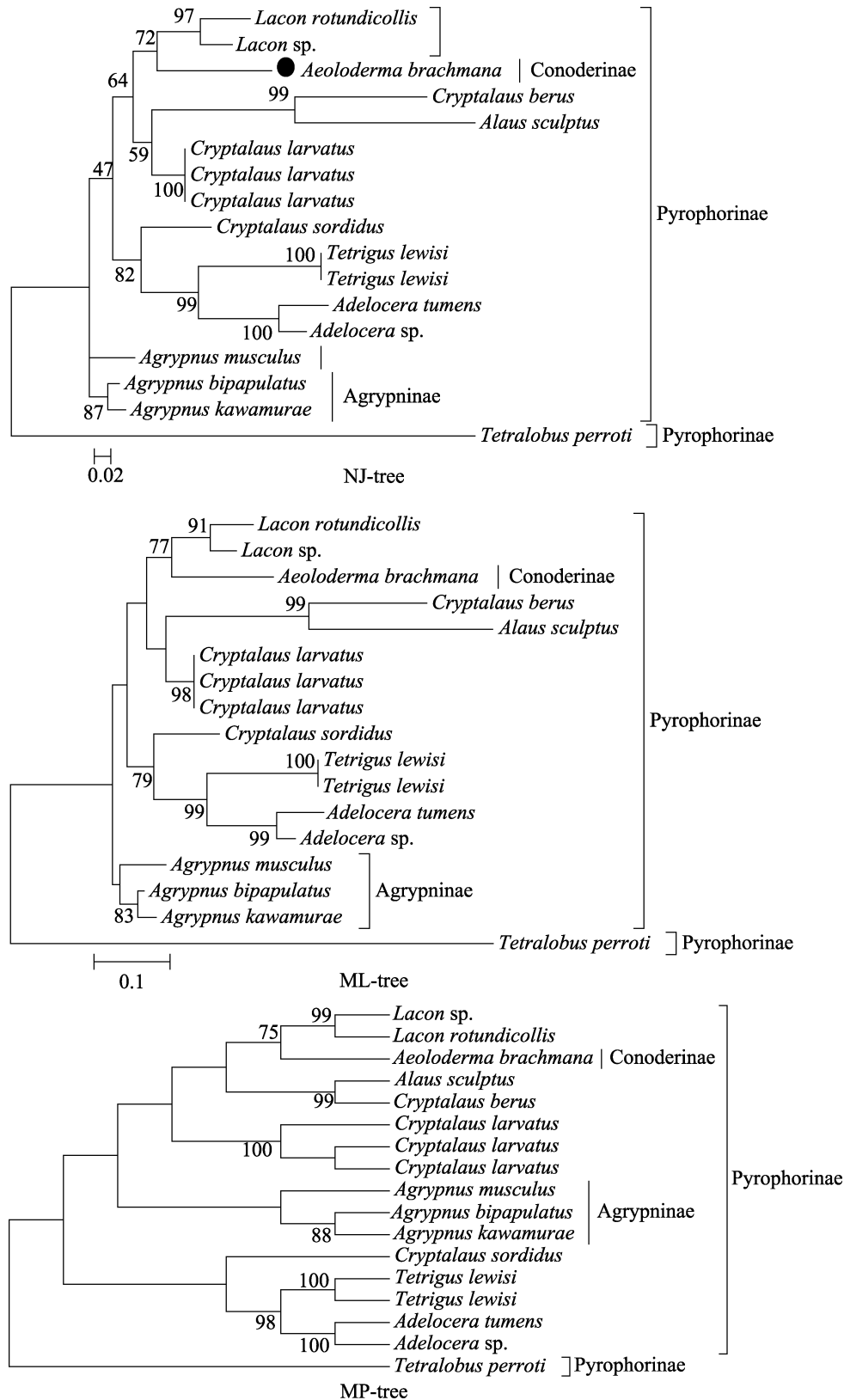
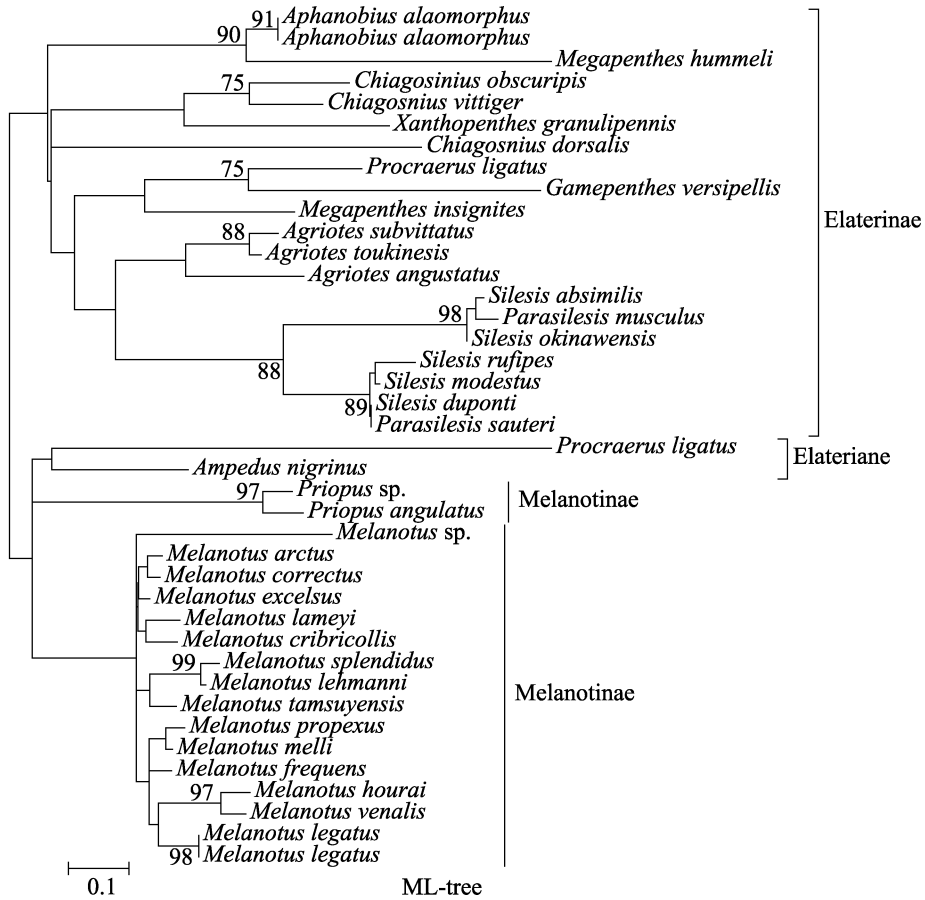
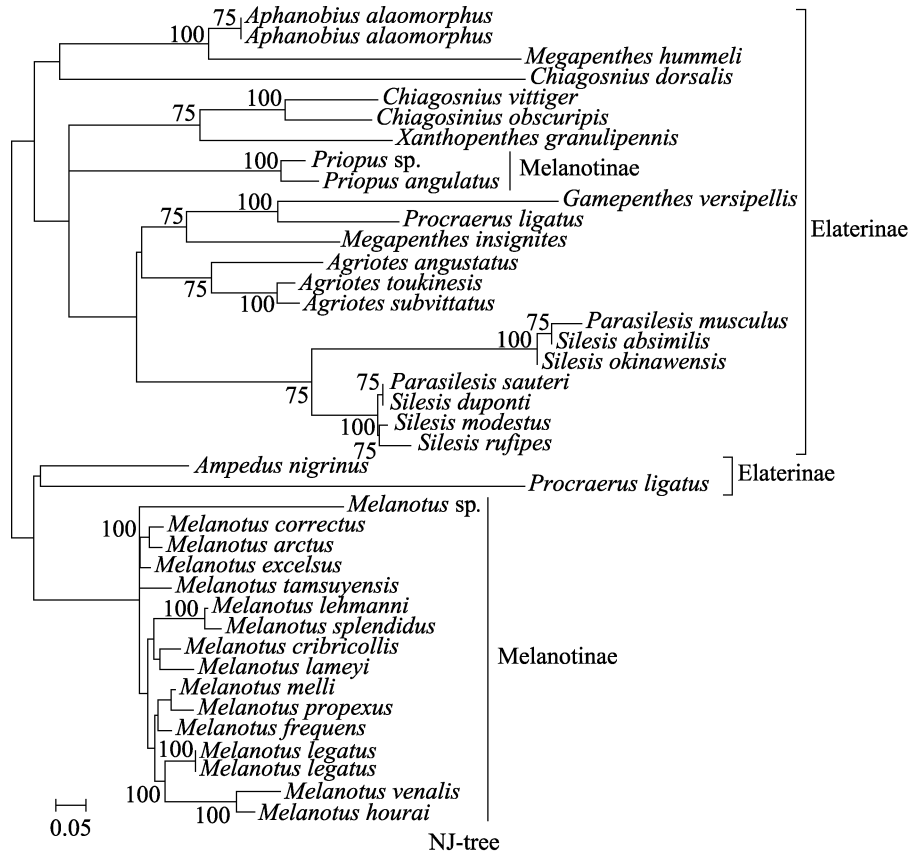


图3 槽缝叩甲亚科, 单叶叩甲亚科与萤叩甲亚科各类群 ITS-2 片段基于邻接法, 最大似然法和最大简约法构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic trees constructed through Neighbor-Joining method, Maximum Likelihood method and Maximum Parsimony method based on ITS-2 sequences of Agrypninae, Conoderinae and Pyrophorinae



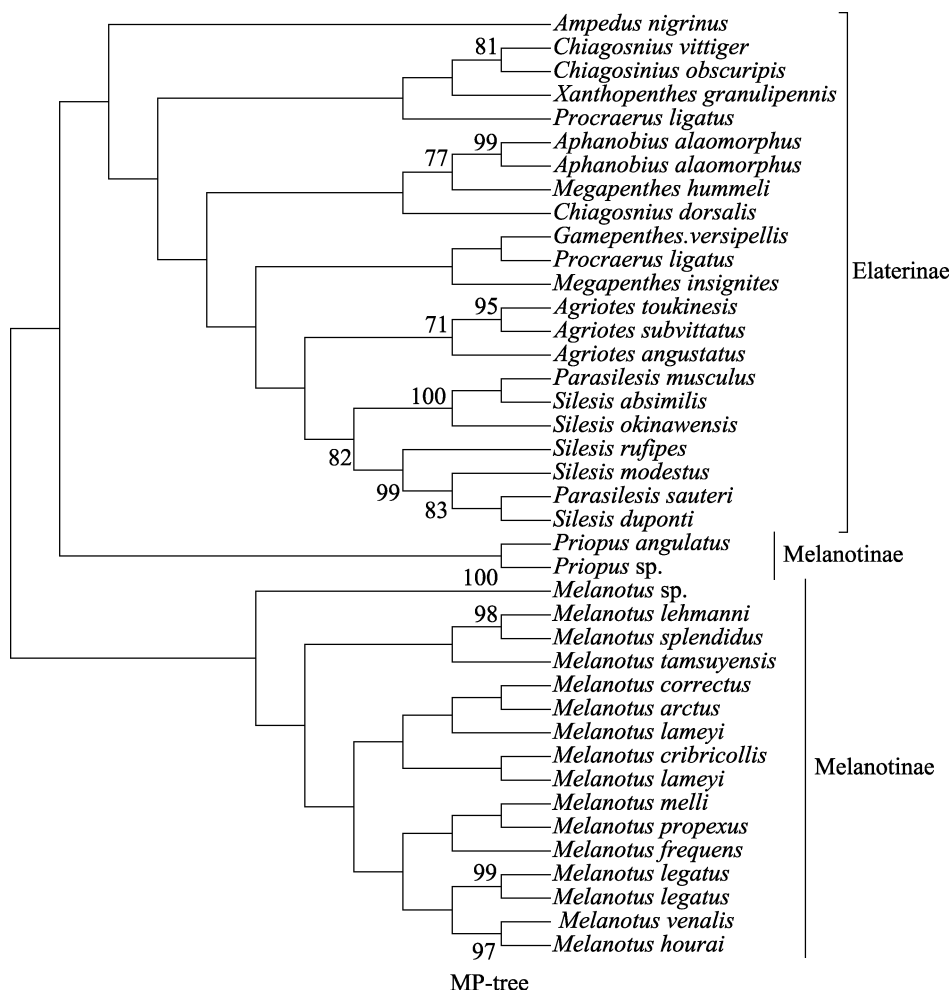


图 4 叩甲亚科与梳爪叩甲亚科各类群 ITS-2 片段基于邻接法，最大似然法和最大简约法构建的系统发育树
 Fig. 4 Phylogenetic trees construted through Neighbor-Joining method, Maximum Likelihood method and Maximum Parsimony method based on ITS-2 sequences of Elaterinae and Melanotinae

树中，梳爪叩甲亚科的两个属弓背叩甲 *Priopus* 同梳爪叩甲属 *Melanotus* 形成并系。MP 树结构同 ML 树和 NJ 树区别在于弓背叩甲属 *Priopus* 的位置不同，MP 树和 NJ 树显示弓背叩甲类群同叩甲亚科类群的亲缘关系要近于梳爪叩甲属 *Melanotus*。

2.4.4 小叩甲亚科与心盾叩甲亚科的系统发育分析

从 ITS-2 区基因序列组成来看，心盾叩甲亚科 *Cardiophorinae* 的 GC 百分含量最低为 58.7%，最高为 65.8%，平均为 63.1%。小叩甲亚科 *Negastrinae* 的 GC 百分含量最低为 51.2%，最高为 59.9%，平均为 55.5%。

采用小叩甲亚科及心盾叩甲亚科部分类群的 ITS-2 基因片段，使用 Tamura 3 - parameter

模型构建 NJ 树，GTR 模型构建 ML 树，CNI 法构建 MP 树。

图 5 所示，NJ 树中，小叩甲亚科与心盾叩甲亚科被聚为一支，其中心盾叩甲亚科呈现了良好的单系性。ML 树结构同 NJ 树的区别在于心盾叩甲亚科的单系性被打破，沙县微叩甲 *Quasimus shaxianensis* Jiang, 1999 同珠叩甲 *Paracardiophorus* sp. 聚为一支。MP 树分支结构同 NJ 树一致。

3 讨论

在 1896 年 Candèze 在其分类系统中建立了尖鞘叩甲族 *Oxynopterides*。Hyslop (1917) 构建的分类系统中，将尖鞘叩甲族 *Oxynopterini* 并入到萤叩甲亚科下。Schenkling (1925, 1927) 随

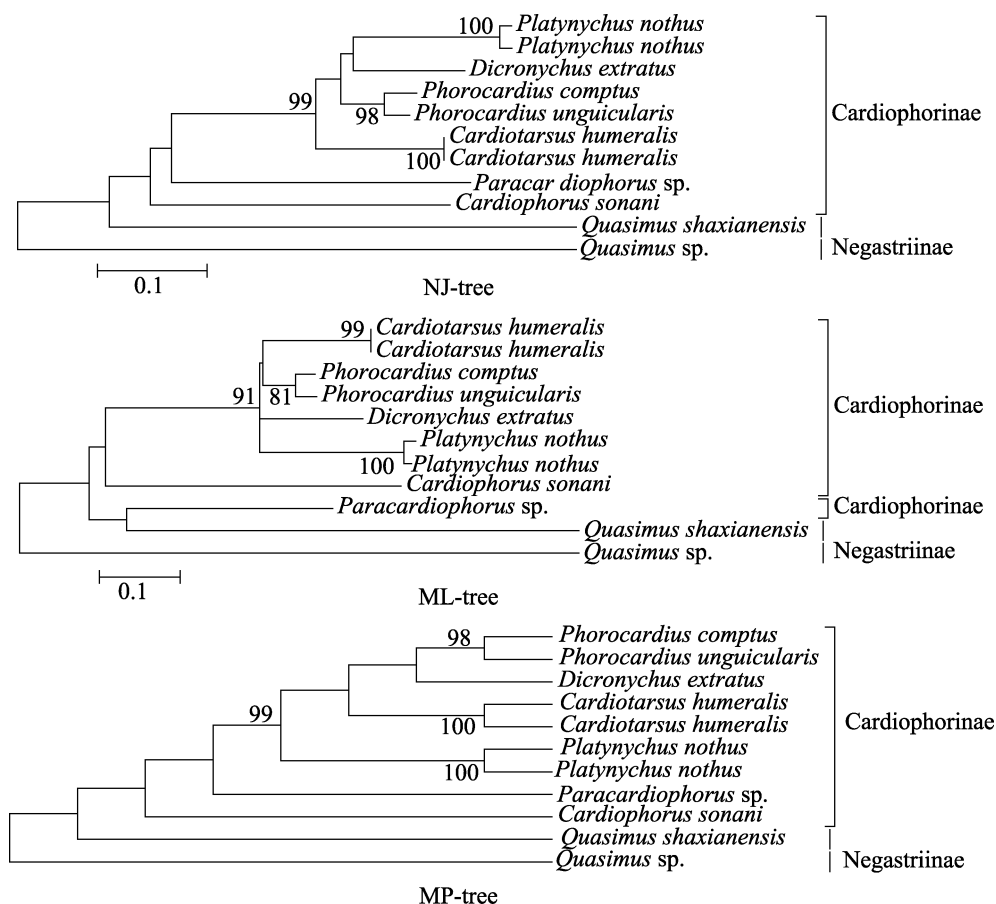


图 5 小叩甲亚科与心盾叩甲亚科各类群 ITS-2 片段基于邻接法, 最大似然法和最大简约法构建的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic trees construted through Neighbor-Joining method, Maximum Likelihood method and Maximum Parsimony method based on ITS-2 sequences of Negastriinae and Cardiophorinae

后将其提升为尖鞘叩甲亚科。在此后的不同分类系统中, 尖鞘叩甲亚科都是作为独立的亚科存在的。Stibick (1979) 系统中, 尖鞘叩甲亚科先同异角叩甲亚科聚类后再与萤叩甲亚科聚为一支。而在 Kishii (1987) 系统, 尖鞘叩甲亚科是作为单独的一支存在的。江世宏和卓晨雷 (2001) 根据外部形态特征对中国叩甲进行系统发育分析, 尖鞘叩甲亚科也同异角叩甲亚科聚为一支。从形态学角度来看, 尖鞘叩甲亚科一般体型较大, 中、后胸腹板在中足基节窝间愈合, 是尖鞘叩甲亚科同其它亚科相比一个较明显的分类特征。近年来一些叩甲科昆虫的分子系统学研究, 支持将尖鞘叩甲亚科同异角叩甲亚科下降为族, 并入齿胸叩甲亚科 (Kundrata and Bocak, 2011), 我们的结果也验证了这一结论。

槽缝叩甲亚科最早是由 Candèze 建立槽缝叩甲族 *Agrypnides* (Candèze, 1857), Schwarz

(1906), 建立的叩甲科 28 族分类系统中包括了槽缝叩甲族 *Agrypnini*。法国叩甲分类学家 Fleutiaux (1920) 将槽缝叩甲族 *Agrypnini* 提升为槽缝叩甲亚科。Schenkling (1925, 1927) 建立的 29 亚科分类系统中, 槽缝叩甲也是作为亚科存在的。Hyslop (1917) 最早根据幼虫特征推导叩甲的系统演化, 将槽缝叩甲类群下降为槽缝叩甲亚族 *Agrypnina*, 位于萤叩甲亚科, 萤叩甲族下面。Ôhira (1962) 建立的分类系统将槽缝叩甲类群作为单独的亚科。Stibick (1979) 结合幼虫与成虫的形态学特征提出的分类系统中, 将槽缝叩甲类群归属于萤叩甲亚科。其后, Ôhira (1999) 重建日本地区叩甲的系统发育关系, 将叩甲合并为 8 个亚科, 把萤叩甲类群归属在槽缝叩甲亚科下。目前国外所采用的一些分类系统, 均将单叶叩甲亚科, 槽缝叩甲亚科和萤叩甲亚科合并为一个亚科 (Stibick, 1979; Sagegami-Oba

et al., 2007)。我们基于 ITS-2 片段构建的系统发育树,结果也支持将槽缝叩甲亚科和单叶叩甲亚科纳入到萤叩甲亚科。

叩甲亚科是叩甲科最大的亚科之一,全世界约有 180 属。Candèze (1857—1863) 最早建立了真叩甲族 *Élatérides vrais*,叩甲亚族 *Elaterites*。Schwarz (1906) 提升为叩甲族 *Elaterini*, Hyslop (1917), Schenkling (1925, 1927) 将 Schwarz 系统中的叩甲族提升为叩甲亚科。Candèze 最早建立的梳爪叩甲族。Schwarz (1906) 也将其作为一个族存在的。Hyslop (1917) 将其同叩甲族一起归属于叩甲亚科。自 Schenkling (1925, 1927) 将其提升为梳爪叩甲亚科后,在此后的各种分类系统中都是作为独立的亚科存在。梳爪叩甲亚科的两个属,梳爪叩甲属与弓背叩甲属,系统发育树的结果显示两个属的亲缘关系要远于传统分类学观点。基于不同分子标记和不同运算方法构建的系统发育树,都证明了叩甲亚科和梳爪叩甲亚科的遗传距离较近,并且梳爪叩甲属亚科都表现出良好的单系性。这也同国外一些相关的研究结论一致 (Sagegami-Oba *et al.*, 2007)。

小叩甲亚科及心盾叩甲亚科体型较小,由于在幼虫形态具有开裂的下颚以及独特的腹板结构,这两个亚科在分类学上一直被认为是较为原始的种群。在以往基于外部形态进行的系统发育分析或者分子系统学研究中,这两个亚科也一直被认为是亲缘关系最为接近的。不同的构树方法都支持心盾叩甲亚科和小叩甲亚科具有较近的亲缘关系,且心盾叩甲亚科的单系性也是同传统的形态分类学相一致。而微叩甲亚科并没有表现出单系性,而是同心盾叩甲亚科共同形成了一个单系群。

本研究利用同源的基因组 ITS-2 基因片段序列对叩甲科 Elateridae 10 个亚科的系统发育关系和进化进行了研究。结果表明,ITS-2 序列能够应用于叩甲科昆虫的系统发育分析,且各亚科之间的遗传距离符合形态学观点。不过系统发育树的结果也同目前沿用的分类系统有所不同,我们根据分析结果,建议对叩甲科的分类系统做出一定的修订。

首先,异角叩甲亚科聚入到尖鞘叩甲亚科内部,这支持了 Stibick (1979) 和 Ôhira (1999) 基于成虫和幼虫形态特征进行系统发育分析的结果。尖鞘叩甲亚科,异角叩甲亚科被聚入齿胸叩甲亚科内部,这与 Segegami-Oba 等 (2007) 的研究结果相一致。结合各亚科的外部形态,我们支持 Ôhira (1999) 提出的分类系统,即将尖鞘叩甲亚科和异角叩甲亚科下降为族,并入齿胸叩甲亚科。其次,槽缝叩甲亚科和单叶叩甲亚科被聚入萤叩甲亚科,这与 Bocakowa 等 (2007) 的结果相一致,缝叩甲亚科和单叶叩甲亚科可以并入萤叩甲亚科。最后,对叩甲亚科和梳爪叩甲亚科类群的系统发育结果显示,梳爪叩甲亚科被聚入到叩甲亚科内部,这个结果也得到国外研究的支持 (Sagegami-Oba *et al.*, 2007; Kundrata and Bocak, 2011),但梳爪叩甲亚科是否并入叩甲亚科内部,还需要结合成虫及幼虫的形态特征进行进一步的分析。

本研究基于核糖体 ITS-2 序列对叩甲科昆虫亚科级分类单元进行系统发育分析,采用邻接法、最大似然法和最大简约法构建系统发育树,不同方法构建的系统树结构基本一致。各亚科之间的亲缘关系支持传统分类学观点,系统发育分析的结果同前期的分子系统学结果相一致 (Bocakova *et al.*, 2007; Sagegami-Oba *et al.*, 2007; Kundrata and Bocak, 2011)。试验结果表明,ITS-2 片段可作为有效的分子标记,应用于叩甲科昆虫的系统学研究。需要注意的是,ITS 序列本身也存在不足之处,它在某些物种间及种内可能具有高度变异性,仅适用于低级分类阶元的相关研究;同时,ITS 序列仅表示物种核基因进化方式,并不能完全阐述物种系统进化关系 (马婷婷等, 2011)。目前应用于昆虫分子系统学研究的基因片段还有核糖体 18S rDNA、28S rDNA、线粒体 16S rDNA 和 Cyt b 基因序列,因为不同基因片段的进化速率不同,可用于不同分类阶元的系统学研究中。在今后的研究中结合多种类型的基因片段,有利于提高系统发育树的准确性,同时,还要引入成虫及幼虫的外部形态特征,才能重建更为真实的分类系统。

参考文献 (References)

- Beebe NW, Saul A, 1995. Discrimination of all members of the *Anopheles punctulatus* complex by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 53 (5): 478–481.
- Bocakova M, Bocak L, Hunt T, Marianna T, Vogler AP, 2007. Molecular phylogenetics of Elateriformia (Coleoptera): evolution of bioluminescence and neoteny. *Cladistics*, 23 (5): 477–496.
- Candèze E, 1857. Monographie des élatérides Vol. 1. Candèze E (eds.). Mémoires De La Société Royale Des Sciences De Liège Sixième Série. Paris: H. DESSAIN. 1–400.
- Dai JX, Yu YZ, Zheng ZM, 2004. Comparative study on genome DNA extraction of tenebrionidae insects. *Journal of Ningxia University (Natural Science Edition)*, 25 (1): 66–68. [代金霞, 于有志, 郑哲民, 2004. 拟步甲昆虫基因组 DNA 提取的比较研究. 宁夏大学学报 (自然科学版), 25 (1): 66–68.]
- Fleutiaux ME, 1920. Les especes Indo-Chine (Col. Ent.). *Annales de la Société Entomologique de France*, (7): 112–125.
- Hyslop JA, 1917. The phylogeny of the Elateridae based on larval characters. *Annals of the Entomological Society of America*, 10 (3): 241–263.
- Jiang SH, Wang SY, 1999. Economic Click Beetle Fauna of China (Coleoptera: Elateridae). Beijing: China Agriculture Press. 1–195. [江世宏, 王书永, 1999. 中国经济叩甲图志. 北京: 中国农业出版社. 1–195.]
- Jiang SH, Zhuo CL, 2001. Cladistic analysis of 12 subfamilies in Chinese Elateridae. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 20 (4): 329–332. [江世宏, 卓晨雷, 2001. 中国叩甲科昆虫 12 亚科的支序分类研究. 华中农业大学学报, 20 (4): 329–332.]
- Kishii TA, 1987. Taxonomic Study of the Japanese Elateridae (Coleoptera), With the Keys to the Subfamilies, Tribes and Genera. Kyoto. 1–262.
- Kundrata R, Bocak L, 2011. The phylogeny and limits of Elateridae (Insecta Coleoptera): is there a common tendency of click beetles to soft-bodiedness and neoteny? *Zoologica Scripta*, 40(4): 364–378.
- Ma TT, Chen G, Liu CX, 2007. Characteristics and application of ITS in entomology. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48 (3): 710–715. [马婷婷, 陈光, 刘春香, 2011. ITS 序列的特点及其在昆虫学研究中的应用. 应用昆虫学报, 48 (3): 710–715.]
- Ôhira H, 1962. Morphological and taxonomic study on the larvae of Elateridae in Japan (Coleoptera). Japan: Entomol. Lab., Aichi Gakugei University, Okazaki.
- Ôhira H, 1999. The systematics of subfamilies in Elateridae from Japan. Booklet for a Lecture in the 17th Annual Meeting of the Japanese Society of Coleopterology. Fukuoka. 1–4.
- Sagegami-Oba R, Oba Y, Ôhira H, 2007. Phylogenetic relationships of click beetles (Coleoptera: Elateridae) inferred from 28S ribosomal DNA: Insights into the evolution of bioluminescence in Elateridae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42 (2): 410–421.
- Schenkling S, 1925. Coleopterorum catalogus, auspiciis et auxilio. Pars 80, Elateridae 1. Berlin: Junk W. 1–263.
- Schenkling S, 1927. Coleopterorum catalogus, auspiciis et auxilio. Pars 88, Elateridae 1. Berlin: Junk W. 264–636.
- Schwarz O, 1906. Genera Insectorum: Coleoptera: Fam. Elateridae. Brussels: Verteneuil & Desmet. 370.
- Stibick JNL, 1979. Classification of the Elateridae (Coleoptera): relationships and classification of the subfamilies and tribes. *Pacific Insects*, 20 (2/3): 145–186.
- Tian YF, Huang G, Zheng ZM, 1999. A simple method for isolation of insect total DNA. *Journal of Shaanxi Normal University (Natural Science Edition)* 27 (4): 82–84. [田英芳, 黄刚, 郑哲民, 1999. 一种简易的昆虫基因组 DNA 提取方法. 陕西师范大学学报 (自然科学版), 27 (4): 82–84.]
- Timmermans MJ, Vogler AP, 2012. Phylogenetically informative rearrangements in mitochondrial genomes of Coleoptera, and monophyly of aquatic elateriform beetles (Dryopoidea). *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 63 (2): 299–304.