

基于线粒体 16S rDNA 和 CO II 基因的 三种高等白蚁分子鉴定与系统发育研究*

肖元玺^{1**} 楚君鹏¹ 李 琰¹ 赵鹏飞² 席玉强³ 宋安东¹ 苏丽娟^{1***}

(1. 河南农业大学生命科学学院, 郑州 450002; 2. 河南省水利勘测设计研究有限公司, 郑州 450016;

3. 河南农业大学植物保护学院, 郑州 450002)

摘 要 【目的】 本文从分子水平对双工土白蚁 *Odontotermes dimorphus* Li et Xiao、中华钩扭白蚁 *Pseudocapritermes sinensis* Ping et Xu、商城奇象白蚁 *Mironasutitermes shangchengensis* Wang et Li 3 种白蚁科高等白蚁进行鉴定和系统发育分析。【方法】 利用 PCR 方法对上述 3 种高等白蚁线粒体 16S rDNA 和 Cytochrome oxidase (CO) 基因进行扩增、测序, 经比对和碱基分析后上传至 GeneBank, 并在数据库中选取白蚁相应基因进行遗传距离和差异碱基数目计算及系统发育研究。【结果】 16S rDNA 和 CO 基因片段长度分别约 385 bp 和 720 bp, 两个基因的 AT 碱基含量均远远大于 GC, 16S rDNA 基因与 3 种高等白蚁遗传距离和差异碱基数目最少的是 0.102 和 35, CO 基因为 0.024 和 16, 由 16S rDNA 和 CO 两个基因构建的系统发育树不一致, CO 基因构建的系统发育树比 16S rDNA 基因更符合科、属的关系。【结论】 通过 16S rDNA 和 CO 基因序列均可将上述 3 种高等白蚁与其它白蚁区别开, CO 基因比 16S rDNA 基因更适合研究白蚁的系统发育研究, 与 3 种白蚁亲缘关系最近的分别是黑翅土白蚁 *Odontotermes formosanus*、台湾华扭白蚁 *Sinocapritermes mushae* 和高山象白蚁 *Nasutitermes takasagoensis*。

关键词 线粒体 DNA, 16S rDNA, CO, 分子鉴定, 系统发育

Molecular identification and phylogeny of three termite species (Isoptera: Termitidae) based on the mitochondrial 16S rDNA and CO II genes

XIAO Yuan-Xi^{1**} CHU Jun-Peng¹ LI Yan¹ ZHAO Peng-Fei²
XI Yu-Qiang³ SONG An-Dong¹ SU Li-Juan^{1***}

(1. College of Life Sciences of Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. Henan Water & Power Engineering Consulting CO, LTD, Zhengzhou 450016, China; 3. College of Plant Protection of Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract [Objectives] To use molecular methods to identify and construct a phylogeny of three termite species; *Odontotermes dimorphus* Li et Xiao, *Pseudocapritermes sinensis* Ping et Xu and *Mironasutitermes shangchengensis* Wang et Li. [Methods] Mitochondrial 16S rDNA and CO II partial gene sequences of the three species were amplified, sequenced and compared. After Blast and base composition analysis, sequences were submitted to the GeneBank database and neighbor-joining trees of the phylogenetic relationships between these and 10 other termites species were constructed. [Results] The three 16S rDNA sequences are about 385 bp long, and the three CO sequences are about 720 bp, long. The proportion of AT is much greater than that of CG in both genes. With respect to 16S rDNA, the minimum genetic distance and number of different nucleotides between the three focal species and the 10 other termite species termites are 0.102 and 35, whereas for CO gene sequences these values are 0.024 and 16. Phylogenies based on the 16S rDNA and CO sequences were consistent, but a phylogeny based on the CO gene conformed more to the established taxonomic relationships between

*资助项目 Supported projects: 河南省自然科学基金项目 (162300410139)

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

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: sulijuan816@126.com

收稿日期 Received: 2017-08-25, 接受日期 Accepted: 2017-09-29

termites families and genera than that based on 16S rDNA. **[Conclusion]** All three termite species can be identified on the basis of variation in 16S rDNA and CO₁ gene sequences but the CO₁ gene is more useful for phylogenetic research than the 16S rDNA gene. The most closely related species to *O. dimorphus*, *P. sinensis* and *M. shangchengensis* were respectively *Odontotermes formosanus*, *Sinocapritermes mushae* and *Nasutitermes takasagoensis*.

Key words *Sogatella furcifera*, migration dynamics, mesoscale source areas, trajectory analysis

白蚁是一种高度社会性的昆虫,据统计,全世界现存白蚁共 292 属 2 878 种,我国有 4 科 44 属共 473 种(程冬保,2012)。白蚁主要分布在热带和亚热带,对家具、房屋、大坝、林木等具有很大的危害,严重影响了人们的生活和生产。据统计,全世界每年在白蚁的防治上要花费至少 220 亿美元(胡剑等,2006)。

白蚁的物种鉴定是研究白蚁的分布、进化的基础,也对白蚁防治很有帮助。常用的白蚁种类鉴定方法是依据兵蚁或有翅成虫的外部形态特征和数据检索,但这种方法具有一定的缺陷,比如:1. 白蚁正常自然群体中,兵蚁通常不足 10%(张先楷,2005),一些种类的白蚁自然群体中兵蚁含量更少,如欧洲散白蚁兵蚁通常不足 5%(Buchli,1956),而更有些白蚁兵蚁比例甚至只有 1%-2%(李秋剑等,2007);成熟的生殖蚁只在接近婚飞的季节才有,受这些条件限制,采集到的样本中可能没有足够数量的成熟个体对其进行外部形态特征鉴定;2. 一些白蚁兵蚁之间形态差异非常小,例如扩头蔡白蚁 *Tsaitermes ampliceps* 和扩头散白蚁 *Reticulitermes ampliceps* 之间的差异是前胸背板中区的刚毛数不同(黄复生等,2000);平行土白蚁和双工土白蚁的差异仅仅是后者的头宽略大于前者,且两者头宽数据之间互有重叠;而且不同的人测量这些特征数据时可能也会有偏差,这不仅增加了鉴定的困难程度也减小了结果的准确度;3. Eggleton 等(1999)认为,中国的白蚁存在被过度描述的情况,有些特征部位度量值在种间存在重叠现象;王建国(2004)指出中国白蚁种类同物异名比例 10%左右,而根据 Kambhampati 和 Eggleton(2000)的研究,非洲白蚁同物异名比例高达 38%等。这些现象的存在导致一些白蚁物种的形态学鉴定并不精准,仅仅通过形态鉴定并不能十分准确的确定

白蚁种类。

线粒体基因具有结构简单、组成保守以及含有系统发育信息等特点,被越来越多用于动物类群的系统地位和系统发育关系的研究(孙铮等,2010),在白蚁中也常用来对白蚁进行物种鉴定、进化和系统发育地位的研究,Szalanski 等(2003)利用 PCR-RFLP 技术对美国中南部的部分散白蚁线粒体 16S rDNA 和 CO₁ 基因序列进行分析研究来区别散白蚁的种类;Sethi 等(2013)在对美洲散白蚁 *Reticulitermes flavipes* 进行纤维素酶研究前使用线粒体 16S rDNA 对白蚁进行物种的确定;权永兵等(2014)用线粒体 CO₁ 基因对海南的 3 种土白蚁 15 个不同地理种群的进行了遗传变异分析;Austin 等(2004)结合数据库中其它白蚁的 CO₁ 基因,对美国北部和加勒比海的部分鼻白蚁的线粒体 CO₁ 基因进行比对和系统发育分析,认为澳白蚁在现存白蚁中是基底血统,并且鼻白蚁来源于齿白蚁;Ohkuma 等(2004)和 Bourguignon 等(2015)分别利用高等白蚁的线粒体 CO₁ 基因和线粒体全基因组的分子系统发育情况进行白蚁的进化关系研究,两者均指出大白蚁亚科是位于白蚁科基底血统的单系,前者还指出白蚁科源于鼻白蚁科,后者认为白蚁科白蚁最可能在非洲或亚洲起源;Bourguignon 等(2016)根据对 415 个白蚁科高等白蚁的线粒体基因组进行的系统发育分析,研究了高等白蚁 5400 万年前至今在全球的传播情况。

据中国动物志记载,在我国分布的高等白蚁有 225 种,其中土白蚁有 27 种,钩扭白蚁 7 种,奇象白蚁 10 种。然而在 NCBI 数据库中,我国的 27 种土白蚁有线粒体基因序列数据的仅有 7 种,而钩扭白蚁和奇象白蚁在数据库中均没有相应的线粒体基因数据。本研究通过对商城奇象白蚁 *M.shangchengensis*、中华钩扭白蚁 *P. sinensis*、

双工土白蚁 *O. dimorphus* 3 种高等白蚁的线粒体 16S rDNA 和 CO₁ 基因序列扩增、测序和系统发育分析, 丰富了 GeneBank 数据库中白蚁的线粒体基因信息, 为上述 3 种高等白蚁的分子鉴定提供参考依据, 也为进一步构建白蚁的系统进化关系、白蚁的迁飞和传入情况研究提供资料。

1 材料与方法

1.1 材料

3 种高等白蚁商城奇象白蚁 *M. shangchengensis*、中华钩扭白蚁 *P. sinensis*、双工土白蚁 *O. dimorphus* 均采自河南省信阳市商城县, 坐标 31°48'N, 115°24'E。

挑取群体中的成年兵蚁, 依据《中国动物志》的描述对其进行外部形态的物种鉴定 (黄复生等, 2000)。

1.2 基因组总 DNA 提取和 PCR 扩增

方法参考彭一丁等 (2017), 解剖针分离白蚁头部于 0.1 mol/L PBS 缓冲液中, 匀浆处理后离心, 取上清再次离心, 用 Soil DNA Kit (OMEGA, American) 参照试剂盒说明书提取全基因组 DNA, 提取后的 DNA 溶于 Elution Buffer 或双蒸水中。使用 2×Taq Plus PCR Master Mix (Tiangen, China) 进行基因扩增, 引物为 16S rDNA, 上游引物: CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT, 下游引物 TTA CGC TGT TAT CCC TAA; CO₁ 上游引物: TCT AAT ATG GCA GAT TAG TGC, 下游引物: GAG ACC AGT ACT TGC TTT CAG TCA TC (Legendre 等, 2008, 华大基因公司合成), 加双蒸水补充总体积为 50 μL。程序为 94℃ 预变性 5 min, 35 个循环的 94℃ 变性 30 s、55℃ 退火 30 s、72℃ 延伸 30 s (CO₁ 延伸时间为 50 s), 72℃ 延伸 10 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测质量, 送生物公司测序 (苏州金唯智生物科技有限公司), 双向测通后进行拼接。

1.3 遗传距离和系统发育分析

测序结果利用 NCBI Blast 进行相似性性搜

索、比对, 并上传至 GeneBank 数据库中, 选取其他 10 种白蚁线粒体 16S rDNA 和 CO₁ 基因序列 (物种名及基因登陆号见表 1), 用 MEGA7 的 Align 程序进行序列对齐和剪切 (若为线粒体基因组则选取 16S rDNA 和 CO₁ 基因序列全长进行对齐, 剪切下相应部分序列), 并计算保守和突变位点; 用 Dnaman8.0 计算碱基组成信息; MEGA7 软件分析遗传距离, Tajima-Nei 模式, 重复数 1 000; 用 MEGA7 分别构建 16S rDNA 和 CO₁ 基因序列的 Neighbor-Joining 系统发育树, 重复数 1 000。

2 结果与分析

2.1 PCR 结果

PCR 结果经测序拼接后分别得到 16S rDNA 基因长度分别为 394、383、385 bp; CO₁ 基因 758、717、716 bp。结果上传至 NCBI Genebank, 3 种白蚁的 16S rDNA 和 CO₁ 基因序列登陆号分别为: 商城奇象白蚁 *M. shangchengensis* KU041141 和 KU058646、中华钩扭白蚁 *P. sinensis* KX129976 和 KX129980、双工土白蚁 *O. dimorphus* KX129975 和 KX129979。

2.2 碱基组成分析

3 种白蚁 16S rDNA 基因序列中各碱基组成比例为 A 23.3%、C 11.4%、G 21.2%、T 44.1%, A+T 比例为 67.4%, G+C 为 33.6%; CO₁ 基因序列中 A 40.1%、C 21.5%、G 13.4%、T 25.1%, A+T 比例为 65.2%, G+C 为 34.8%, 两种基因的 AT 均含量远远大于 GC 含量。结合 Genebank 中 10 种白蚁线粒体基因信息 (表 1), 经 Align 程序进行序列对齐和剪切后, 16S rDNA 基因长度约 390 bp, CO₁ 基因长度约 685 bp。

2.3 遗传距离及碱基差异分析

13 种白蚁的 16S rDNA 基因和 CO₁ 基因的遗传距离及碱基差异见表 1 和表 2。经分析, 13 种白蚁的 16S rDNA 基因保守位点有 110 个, 突变位点 342 个, 简约信息 179 个, 单元素集合位点 71 个; 差异减计数在 3-255 bp 之间, 差异碱

表 1 所选取白蚁来源及其相应基因登录号
Table 1 Sources and GenBank accession numbers of the chosen samples

物种 Species	16S rDNA	CO II	分布地 Locality
湖南散白蚁 <i>Reticulitermes hunanensis</i>	KX129972	KX129977	河南省商城县 Shangcheng, Henan Province, China
平额散白蚁 <i>Reticulitermes planifrons</i>	KX129974	KX129978	河南省商城县 Shangcheng, Henan Province, China
侏儒散白蚁 <i>Reticulitermes minutus</i>	KT987422	KX129981	河南省商城县 Shangcheng, Henan Province, China
近暗散白蚁 <i>Reticulitermes perillucifugus</i>	KX129973	KX290714	河南省商城县 Shangcheng, Henan Province, China
台湾乳白蚁 <i>Coptotermes formosanus</i>	AB626145 (mitochondrial genome)		日本冲绳岛 Okinawa Island, Japan
黑翅土白蚁 <i>Odontotermes formosanus</i>	KP026254 (mitochondrial genome)		日本西表岛 Iriomote Island, Japan
台湾华扭白蚁 <i>Sinocapritermes mushae</i>	KP026255 (mitochondrial genome)		日本西表岛 Iriomote Island, Japan
高山象白蚁 <i>Nasutitermes takasagoensis</i>	KP026260 (mitochondrial genome)		日本西表岛 Iriomote Island, Japan
<i>Nasutitermes bikpelanus</i>	KP026296 (mitochondrial genome)		Nabire, West Papua, Indonesia
海南土白蚁 <i>Odontotermes hainanensis</i>	NC_034028 (mitochondrial genome)		马来西亚半岛 Peninsular Malaysia

表 2 13 种白蚁线粒体 16S rDNA 基因序列 Tajima-Nei 遗传距离 (左下) 和差异碱基数 (右上, 包括缺失碱基)
Table 2 Tajima-Nei genetic distance matrix (below diagonal) and number of difference of nucleotides (above diagonal, including nucleotide deletion mutation) of 11 termites species mitochondrial 16S rDNA gene sequences

编号 No.	物种 Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	近暗散白蚁 <i>R. perillucifugus</i>	***	30	14	3	24	218	90	55	221	68	77	69	212
2	侏儒散白蚁 <i>R. minutus</i>	0.112	***	47	31	43	224	114	77	220	89	89	89	220
3	平额散白蚁 <i>R. planifrons</i>	0.005	0.106	***	14	22	223	90	50	211	68	69	72	215
4	湖南散白蚁 <i>R. hunanensis</i>	0.000	0.112	0.005	***	23	212	87	52	214	65	64	63	208
5	黑翅土白蚁 <i>O. formosanus</i>	0.093	0.201	0.087	0.093	***	176	7	50	173	42	43	45	167
6	双工土白蚁 <i>O. dimorphus</i>	1.805	1.904	1.829	1.805	1.661	***	255	255	62	254	253	251	61
7	海南土白蚁 <i>O. hainanensis</i>	0.087	0.194	0.081	0.087	0.01	1.739	***	103	254	94	95	101	246
8	台湾乳白蚁 <i>C. formosanus</i>	0.065	0.161	0.058	0.065	0.112	1.555	0.106	***	253	80	80	87	249
9	中华钩扭白蚁 <i>P. sinensis</i>	2.191	2.733	2.246	2.191	2.008	0.184	2.177	1.800	***	253	250	251	35
10	高山象白蚁 <i>N. takasagoensis</i>	0.088	0.187	0.082	0.088	0.106	1.522	0.094	0.053	1.694	***	27	52	249
11	<i>N. bikpelanus</i>	0.082	0.18	0.076	0.082	0.113	1.573	0.100	0.059	1.764	0.016	***	59	255
12	台湾华扭白蚁 <i>S. mushae</i>	0.088	0.187	0.082	0.088	0.131	1.490	0.119	0.076	1.729	0.059	0.043	***	247
13	商城奇象白蚁 <i>M. shangchengensis</i>	1.634	1.925	1.654	1.634	1.441	0.170	1.503	1.462	0.102	1.417	1.449	1.353	***

基数最少的是 *R. perillucifugus* 与 *R. hunanensis* ,
N. bikpelanus 与 *M. shangchengensis* 最多; 遗传距
离在 0-2.733 之间 *R. perillucifugus* 与 *R. hunanensis*
遗传距离最小, *R. minutus* 与 *P. sinensis* 最大; 与
双工土白蚁 *O. dimorphus* 和中华钩扭白蚁 *P.*

sinensis 碱基差异最小的均为商城奇象白蚁 *M.*
shangchengensis , 差异碱基分别为 61 和 35 , 遗
传距离分别为 0.179 和 0.102 , 与商城奇象白蚁
M. shangchengensis 差距最小的是中华钩扭白蚁
P. sinensis。13 个 16S rDNA 序列之间存在严重的

碱基缺失和替换现象, 缺失主要为 T 碱基的缺失, 而替换主要发生在 A-G、T-C 之间, 同属之间的白蚁也有较为严重的碱基缺失现象。

13 种白蚁的 CO_{II} 基因保守位点有 403 个, 突变位点 282 个, 简约信息 197 个, 单元素集合位点 85 个; 差异碱基数在 0-184 之间, 遗传距离在 0-0.352 之间, *R. planifrons* 与 *R. hunanensis* 的 CO_{II} 基因无差异, 遗传距离也为 0; *R. perilucifugus* 与 *P. sinensis* 碱基差异最多, 遗传距离也最大; 与双工土白蚁 *O. dimorphu*、中华钩扭白蚁 *P. sinensis*、商城奇象白蚁 *M. shangchengensis* 碱基差异数目和遗传距离差异最大的分别是黑翅土白蚁 *O. formosanus*、台湾

华扭白蚁 *S. mushae*、高山象白蚁 *N. takasagoensis*, 差异碱基数分别为 16、17、68, 遗传距离分别为 0.024、0.026、0.109。属于同一属白蚁的 CO_{II} 基因序列之间不存在缺失现象, 只有土白蚁属的 3 种白蚁 *O. formosanus*、*O. dimorphus* 和 *O. hainanensis* 与其它 10 种白蚁之间存在 6 个碱基的缺失 (表中未显示), 此 3 种土白蚁之间、其它 9 种白蚁之间均不存在碱基缺失, 碱基替换主要发生在 A-G、T-C 之间。

2.4 系统发育分析

13 种白蚁的线粒体 16S rDNA 和 CO_{II} 基因 Neighbor-Joining 系统发育树如图 1 和图 2。图 1

表 3 13 种白蚁线粒体 CO_{II} 基因 Tajima-Nei 遗传距离 (左下) 和差异碱基数 (右上, 包括缺失碱基)
Table 3 Tajima-Nei genetic distance matrix (below diagonal) and number of difference of nucleotides (above diagonal, including nucleotide deletion mutation) of 13 termites species mitochondrial CO_{II} gene sequences

编号 No.	物种 Spiece	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	近暗散白蚁 <i>R. perilucifugus</i>	***	101	100	100	181	176	167	151	184	182	182	181	173
2	侏儒散白蚁 <i>R. minutus</i>	0.169	***	1	1	136	131	129	96	134	134	138	131	122
3	平额散白蚁 <i>R. planifrons</i>	0.168	0.001	***	0	136	131	129	96	134	134	138	131	122
4	湖南散白蚁 <i>R. hunanensis</i>	0.168	0.001	0	***	136	131	129	96	134	134	138	131	122
5	黑翅土白蚁 <i>O. formosanus</i>	0.329	0.231	0.231	0.231	***	16	37	123	111	125	110	110	117
6	双工土白蚁 <i>O. dimorphus</i>	0.317	0.220	0.221	0.221	0.024	***	33	118	106	121	108	103	109
7	海南土白蚁 <i>O. hainanensis</i>	0.297	0.216	0.216	0.216	0.058	0.051	***	117	118	126	115	117	120
8	台湾乳白蚁 <i>C. formosanus</i>	0.263	0.158	0.156	0.156	0.215	0.206	0.203	***	130	136	136	129	126
9	中华钩扭白蚁 <i>P. sinensis</i>	0.352	0.228	0.228	0.228	0.194	0.183	0.209	0.234	***	100	100	17	96
10	高山象白蚁 <i>N. takasagoensis</i>	0.330	0.225	0.225	0.225	0.221	0.212	0.223	0.241	0.169	***	74	100	68
11	<i>N. bikpelanus</i>	0.327	0.234	0.234	0.234	0.189	0.185	0.200	0.242	0.168	0.119	***	99	75
12	台湾华扭白蚁 <i>S. mushae</i>	0.327	0.221	0.221	0.221	0.192	0.177	0.207	0.232	0.026	0.169	0.167	***	91
13	商城奇象白蚁 <i>M. shangchengensis</i>	0.307	0.201	0.199	0.199	0.205	0.188	0.211	0.223	0.165	0.109	0.122	0.155	***

显示, 3 种来自河南商城的高等白蚁商城奇象白蚁 *M. shangchengensis*、中华钩扭白蚁 *P. sinensis* 和双工土白蚁 *O. dimorphus* 与其他 10 种白蚁明显不在同一分支, 而与这 3 种白蚁同处白蚁科的 5 种高等白蚁黑翅土白蚁 *O. formosanus*、台湾华扭白蚁 *S. mushae*、高山象白蚁 *N. takasagoensis*、*N. bikpelanus* 海南土白蚁 *O. hainanensis* 的亲缘

关系与鼻白蚁科的 4 种散白蚁较上述 3 种高等白蚁更近, 双工土白蚁 *O. dimorphus* 与同一属的海南土白蚁 *O. hainanensis* 和黑翅土白蚁 *O. formosanus* 也不在同一分类簇, 分支情况看不出明显的科、属关系。

图 2 显示 4 种散白蚁单独形成一支分类簇, 与白蚁科的 8 种白蚁分支较早, 台湾乳白蚁 *C.*

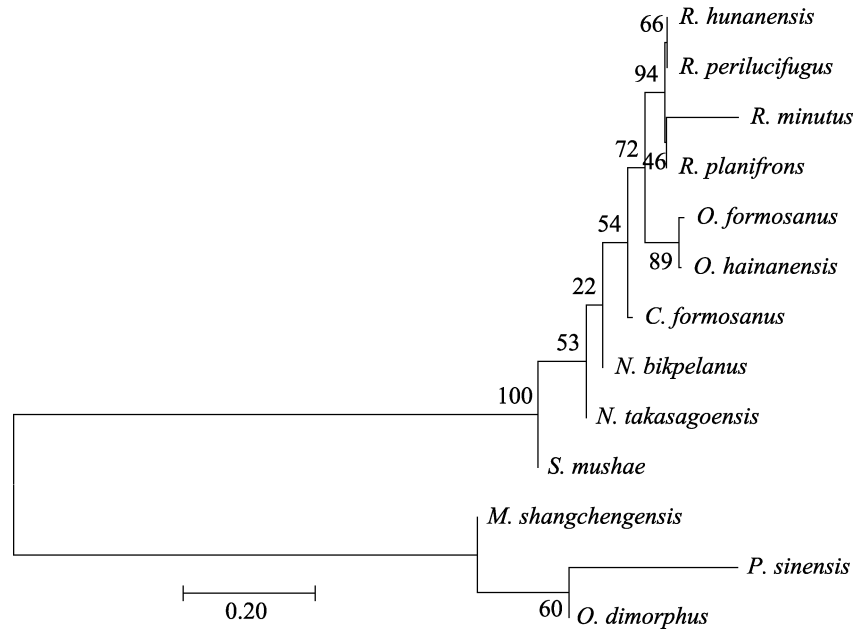


图 1 13 种白蚁线粒体 16S rDNA 基因 Neighbor-Joining 系统发育树

Fig. 1 Neighbor-Joining phylogenetic tree inferred from 13 mitochondrial 16S rDNA gene sequences

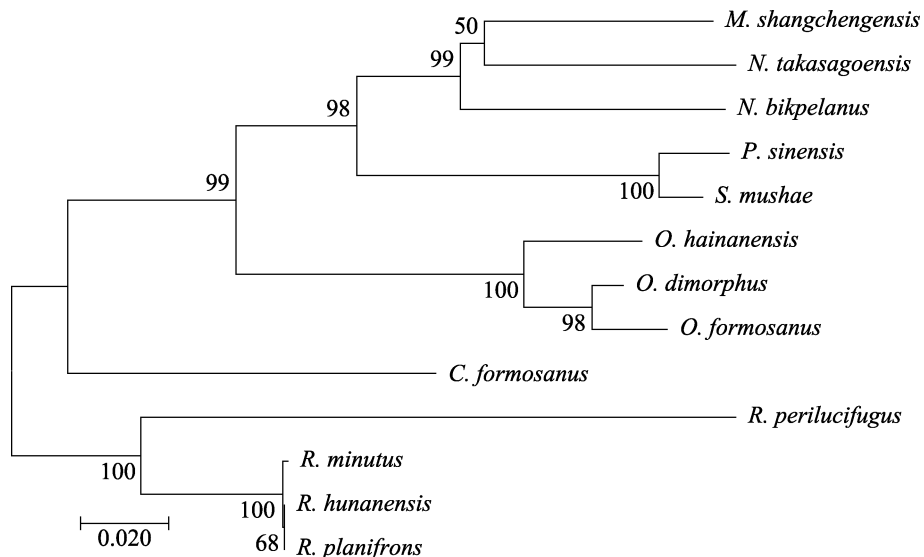


图 2 13 种白蚁线粒体 CO II 基因 Neighbor-Joining 系统发育树

Fig. 2 Neighbor-Joining phylogenetic tree inferred from 13 mitochondrial CO II gene sequences

formosanus 单独形成一个分支且介于 8 种高等白蚁与 4 种散白蚁之间, 黑翅土白蚁 *O. formosanus*、双工土白蚁 *O. dimorphus*、海南土白蚁 *O. Hainanensis* 3 种土白蚁单独形成一支分支, 中华钩扭白蚁 *P. sinensis* 和海南扭白蚁 *S. mushae* 形成一个分支, 两种象白蚁 *N. takasagoensis* 和 *N. bikpelanus* 与商城奇象白蚁 *M. shangchengensis* 也在较近的分支上。

3 讨论

本研究通过对采自河南商城的商城奇象白蚁 *M. shangchengensis*、双工土白蚁 *O. dimorphus* 和中华钩扭白蚁 *P. sinensis* 的线粒体 16S rDNA 和 CO₁ 基因进行 PCR 扩增、测序, 并将序列上传至 GeneBank 数据库, 丰富了数据库中白蚁的线粒体基因信息, 也为上述 3 种白蚁的分子鉴定和系统发育分析提供了资料。

本研究结合 GeneBank 数据库中 10 种白蚁的相关数据对上述 3 种高等白蚁线粒体 16S rDNA 和 CO₁ 基因进行遗传距离、差异碱基和系统发育分析。通过 16S rDNA 基因的遗传距离和差异碱基分析 (表 2), 双工土白蚁 *O. dimorphus*、中华钩扭白蚁 *P. sinensis*、商城奇象白蚁 *M. shangchengensis* 遗传距离和碱基数目差异最小分别为 0.179、0.102、0.102 和 61、35、35; 上述 3 种高等白蚁 CO₁ 基因序列遗传距离和碱基数目差异 (表 3) 最小分别为 0.024、0.026、0.109 和 16、17、68; 通过 16S rDNA 和 CO₁ 基因序列均可将上述 3 种高等白蚁与其它白蚁区别开。从构建的 16S rDNA 的 Neighbor-Joining 系统发育树 (图 1) 来看, 上述 3 种白蚁与其它 6 种白蚁科高等白蚁的亲缘关系较 4 种鼻白蚁科的散白蚁远, 双工土白蚁 *O. dimorphus* 与其它两种土白蚁不在同一分支甚至差距很远, 图 1 中 13 种白蚁的系统发育情况分支情况表现不出明显的科、属关系; 13 种白蚁 CO₁ 基因的 Neighbor-Joining 系统发育树 (图 2) 可以看出, 4 种散白蚁与其它 9 种高等白蚁的亲缘关系较远, 3 种土白蚁形成一支分类簇, 剩余几种白蚁

的分支情况可基本符合出科、属的关系, 因此我们认为 CO₁ 基因比 16S rDNA 更适合于白蚁系统发育的研究; Su 等 (2006) 认为与 16S 和 12S rDNA 相比, CO₁ 基因能提供最有益的系统发育信息; 彭一丁等 (2017) 也认为 CO₁ 基因较 16S rDNA 更适合于白蚁系统发育的研究; 本研究的结果也支持两者的观点, 因此本研究的 13 种白蚁的系统发育情况以图 2 为准: 商城奇象白蚁 *M. shangchengensis* 与高山象白蚁 *N. takasagoensis* 的亲缘关系较 *N. bikpelanus* 近, 双工土白蚁 *O. dimorphus* 与黑翅土白蚁 *O. formosanus* 的亲缘关系较海南散白蚁 *O. hainanensis* 近, 中华钩扭白蚁 *P. sinensis* 与台湾华扭白蚁 *S. mushae* 的关系较台湾乳白蚁 *C. formosanus* 近, 3 种来自河南商城的高等白蚁商城奇象白蚁 *M. shangchengensis*、双工土白蚁 *O. dimorphus* 和中华钩扭白蚁 *P. sinensis* 与来自同地区的 4 种散白蚁亲缘关系均相距较远。

由于白蚁形态鉴定方法的缺陷, 线粒体基因也可被用于白蚁形态鉴定物种的重新厘定: 王建国 (2004) 基于白蚁线粒体 16S rDNA 和 CO₁ 基因结合形态特征, 认为凶土白蚁 *Odontotermes fontanellus*、洛阳土白蚁 *Odontotermes luoyangensis*、紫阳土白蚁 *Odontotermes ziyangensis* 均为黑翅土白蚁 *O. formosanus* 的新异名, 粗颚土白蚁 *Odontotermes graveli* 与长颚土白蚁 *Odontotermes longignathus* 为同一物种, 曲颚乳白蚁 *Coptotermes curvignathus* 与端明乳白蚁 *Coptotermes elisal* 为同一物种; 张卫东等 (2010) 通过线粒体 16S rDNA 基因序列对口岸经常截获的 6 种乳白蚁进行系统发育研究, 指出台湾乳白蚁 *C. formosanus* 与广州乳白蚁 *Coptotermes guangzhouensis* 存在同物异名的可能; Ye 等 (2004) 通过对美国常见的 6 种散白蚁线粒体 CO₁、16S 和 12S rDNA 序列进行系统发育分析, 推断 *R. flavipes*、*Reticulitermes arenicola* 和 *Reticulitermes santonensis* 是同一物种, Austin 等 (2005) 和 Su 等 (2006) 对多个地区的散白蚁线粒体基因的研究也支持了 Ye 等 (2004) 的 *R. flavipes* 和 *R. santonensis* 是同一物种的观点。

白蚁线粒体基因也被用于新物种的发现, Cheng 等 (2011) 利用 16S rDNA 和 CO 基因序列对马来西亚半岛 11 种土白蚁进行了分子鉴定和系统发育研究, 指出其中两种是在马来西亚半岛上首次发现的 *Odontotermes escherichi* 和 *O. hainanensis*; Lee 等 (2015) 利用线粒体 CO 和 CO 基因序列结合兵蚁形态学特征确定了韩国的一种新白蚁种类 *Reticulitermes kanmonensis*; Ghesini 等 (2015) 利用线粒体 16S rDNA 和 CO 基因研究了 Levant 盆地 11 个地区木白蚁科白蚁的遗传距离和系统发育情况, 指出该研究中的木白蚁并非 *Kaloterms flavicollis* 而是一种新的木白蚁, 将其命名为 *Kaloterms phoeniciae* 并进行了形态学的描述; 随着生物学技术的发展和数据库的丰富, 白蚁线粒体基因被用来进行白蚁种类鉴定以及系统发育分析将会更加简便准确。

线粒体基因不仅可以弥补白蚁形态鉴定的缺陷, 使白蚁种类的鉴定更加准确, 也能对白蚁的进化和系统发育关系研究提供有力的证据。随着研究的深入以及数据库的不断丰富, 白蚁线粒体在白蚁的种类鉴定以及进化和系统发育研究上的作用将会越来越大。

参考文献 (References)

- Austin JW, Szalanski AL, Cabrera BJ, 2004. Phylogenetic analysis of the subterranean termite family *Rhinotermitidae* (isoptera) by using the mitochondrial cytochrome oxidase gene. *Annals of the Entomological Society of America*, 97(3): 548–555.
- Austin JW, Szalanski AL, Scheffrahn RH, Messenger MT, Dronnet S, Bagneres AG, 2005. Genetic evidence for the synonymy of two *Reticulitermes* species: *Reticulitermes flavipes* and *Reticulitermes santonensis*. *Annals of the Entomological Society of America*, 98(3): 395–401.
- Bourguignon T, Lo N, Cameron SL, Šobotník J, Hayashi Y, Shigenobu S, Watanabe D, Roisin V, Miura T, Evans AT, 2015. The evolutionary history of termites as inferred from 66 mitochondrial genomes. *Molecular Biology & Evolution*, 32(2): 406–453.
- Bourguignon T, Lo N, Šobotník J, Ho SY, Iqbal N, Coissac E, Lee M, Jendryka M, David SD, Křížková B, Roisin Y, Evans TA, 2016. Mitochondrial phylogenomics resolves the global spread of higher termites, ecosystem engineers of the tropics. *Molecular Biology & Evolution*, 34(3): 589–597.
- Buchli H, 1956. Le cycle de developement des Castes chez *Reticu litternese*. *Insect Sociaux*, 3(3): 395–401.
- Cheng S, Kirton LG, Panandam JM, Siraj SS, Ng KS, Tan SG, 2011. Evidence for a higher number of species of *Odontotermes* (Isoptera) than currently known from peninsular Malaysia from mitochondrial DNA phylogenies. *PLoS ONE*, 6(6): e20992.
- Cheng DB, 2012. Research progress taxonomy of Isoptera. Proceedings Central China Symposium on Insect Research, Yichang. 257–263. [程冬保, 2012. 等翅目分类学研究进展. 华中昆虫研究研讨会论文集. 宜昌. 257–263.]
- Eggleton P, 1999. Termite species description rates and the state of termite taxonomy. *Insects Society*, 46(1): 1–5.
- Ghesini S, Marini M, 2015. Molecular characterization and phylogeny of *Kaloterms* populations from the levant, and description of *Kaloterms phoeniciae* sp. nov. *Bulletin of Entomological Research*, 105(3): 285–293.
- Hu J, Zhong HJ, Guo MF, 2006. A review of physical barriers against termites. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 43(1): 27–32. [胡剑, 钟俊鸿, 郭明昉, 2006. 物理屏障预防白蚁技术的研究及应用. 应用昆虫学报, 43(1): 27–32.]
- Huang FS, Ping ZM, Zhu SM, 2000. Fauna Sinica Insecta. Vol.17. Isoptera. Beijing: Science Press. 548–889. [黄复生, 平正明, 朱世模, 2000. 中国动物志·昆虫纲. 第 17 卷. 等翅目. 北京: 科学出版社. 548–889.]
- Kambhampati S, Eggleton P, 2000. Taxonomy and Phylogeny of Termites. Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology. Berlin: Springer Netherlands. 1–23.
- Lee W, Choi DS, Ji JY, Kim N, Han JM, Park SH, Lee S, Seo MS, Hwang WJ, Forschler BT, Takematsu Y, Lee YH, 2015. A new record of *Reticulitermes kanmonensis*, takematsu, 1999 (Isoptera: Reticulitermes) from Korea. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 18(3): 351–359.
- Legendre F, Whiting MF, Bordereau C, Cancellato EM, Evan TA, Grandcolas P, 2008. The phylogeny of termites (Dictyoptera: Isoptera) based on mitochondrial and nuclear markers: Implications for the evolution of the worker and pseudergate castes, and foraging behaviors. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48(2): 615–627.
- Li QJ, Zhong JH, Liu BR, 2007. Progress in effects of juvenile hormone analogues on termites. *Natural Enemies of Insects*, 29(1): 40–47. [李秋剑, 钟俊鸿, 刘炳荣, 2007. 保幼激素类似物对白蚁的作用研究进展. 昆虫天敌, 29(1): 40–47.]
- Ohkuma M, Yuzawa H, Amornsak W, Sornnuwat Y, Takematsu Y, Yamada A, Vongkaluang C, Samthoy O, Kirtibutr N, Noparatnaraporn N, Kudo T, 2004. Molecular phylogeny of Asian termites (Isoptera) of the families Termitidae and Rhinotermitidae based

- on mitochondrial CO₁ sequences. *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 31(2): 701–710.
- Peng YD, Xiao YX, Chu JP, Li Y, Xi YQ, Zhang CY, Song AD, Wang FQ, Su LJ, 2017. Molecular identification and phylogeny of four *Reticulitermes* species (Isoptera: Rhinotermitidae). *Chinese Journal of Applied Entomology*, 54(3): 400–406. [彭一丁, 肖元玺, 楚君鹏, 李琰, 席玉强, 张成玉, 宋安东, 王凤芹, 苏丽娟, 2017. 四种散白蚁的分子鉴定及系统发育地位 (等翅目, 鼻白蚁科). 应用昆虫学报, 54(3): 400–406.]
- Quan YB, Liao L, Wang L, Xu MF, Wang JG, Zhang WD, 2014. Phylogenetic analysis of three *Odontotermes holmgreni* based on mitochondrial CO₁ sequences. *Guangdong Agricultural Sciences*, 41(12): 161–164. [权永兵, 廖力, 王岚, 徐森峰, 王建国, 张卫东, 2014. 基于线粒体 CO₁ 基因的 3 种土白蚁系统发育分析. 广东农业科学, 41(12): 161–164.]
- Sethi A, Kovaleva ES, Slack JM, Brown S, Buchman GW, Scharf ME, 2013. A GHF7 cellulase from the protist symbiont community of *Reticulitermes flavipes* enables more efficient lignocellulose processing by host enzymes. *Archives of Insect Biochemistry & Physiology*, 84(4): 175–193.
- Su NY, Ye WM, Ripa R, Scheffrahn RH, Giblin-Davis RM, 2006. Identification of Chilean *Reticulitermes* (Isoptera: Rhinotermitidae) inferred from three mitochondrial gene DNA sequences and soldier morphology. *Annals of the Entomological Society of America*, 99(2): 352–363.
- Sun Z, Zhang J, Wang R, Xu YJ, Zhang DQ, 2010. Progress of insect mitochondrial genome. *Inspection and Quarantine Science*, 20(3): 69–73. [孙铮, 张吉, 王荣, 徐月静, 张大谦, 2010. 昆虫线粒体基因的研究进展. 检验检疫学刊, 20(3): 69–73.]
- Szalanski AL, Austin JW, Owens CB, 2003. Identification of *Reticulitermes* spp. (Isoptera: Reticulitermitidae) from south central United States by PCR–RFLP. *Journal of Economic Entomology*, 96(5): 1514–1519.
- Wang JH, 2004. Phylogenetic study of termites based on the morphological and molecular approaches. Doctoral dissertation, Guangzhou: South China Agricultural University. [王建国, 2004. 分子系统学方法在白蚁分类中的应用. 博士学位论文. 广州: 华南农业大学.]
- Ye W, Lee CY, Scheffrahn RH, Aleong JM, Su NY, Bennett GW, 2004. Phylogenetic relationships of nearctic *Reticulitermes* species (Isoptera: Rhinotermitidae) with particular reference to *Reticulitermes arenicola* Goellner. *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 30(3): 815–822.
- Zhang WD, Xu M, Liao L, Le HY, Chen QW, Chi YL, 2010. Phylogenetic analysis of genus *Coptotermes* (Isoptera: Rhinotermitidae) based on 16S rRNA gene. *Entomotaxobomia*, 32(2): 93–99. [张卫东, 徐森峰, 廖力, 乐海洋, 陈其文, 迟远丽, 2010. 乳白蚁属部分种类 16S rRNA 的分子系统发育关系. 昆虫分类学报, 32(2): 93–99.]
- Zhang XK, 2005. Caste ratios of the termite *Coptotermes*. *Chinese Bulletin of Entomology*, 42(3): 321–323. [张先楷, 2005. 乳白蚁不同品级的比例. 昆虫知识, 42(3): 321–323.]