



基于线粒体 CO I 基因的弓背蚁族 系统发育研究*

李文杰^{1,2**} 陈志林^{1,2} 周善义^{1,2***}

(1. 珍稀濒危动植物生态与环境保护教育部重点实验室, 广西师范大学, 桂林 541004; 2. 广西师范大学生命科学学院, 桂林 541004)

摘要 【目的】弓背蚁族是蚁亚科中最大的一个族, 该族分布广泛, 存在多型现象, 地理变异且种间差别微小, 尚无人对该族进行全面系统的研究报道。将传统形态分类手段和分子特征分析方法结合起来, 有助于建立中国弓背蚁族的鉴定系统以及蚁科昆虫更完善的系统发育关系。【方法】本文对弓背蚁族 234 头 24 种蚂蚁的线粒体 CO I 基因序列进行了 PCR 扩增和测序, 应用贝叶斯法 (Bayesian inference, BI) 和最大似然法 (Maximum likelihood, ML) 重建了弓背蚁族部分种类的系统发育关系。【结果】弓背蚁族共有 13 种单独聚成一支, 与形态鉴定结果基本一致。弓背蚁属 11 种的系统发育关系为 (日本弓背蚁 *C. japonicus*+少毛弓背蚁 *C. spanis*+褐毛弓背蚁 *C. fuscivillosus*+未知种 *Camponotus* sp.1+ (平和弓背蚁 *C. mitis*+ (四斑弓背蚁 *C. quadrinotatus*+尼科巴弓背蚁 *C. nicobarensis*)+哀弓背蚁 *C. dolendus*+ (沃斯曼弓背蚁 *C. wasmanni*+截胸弓背蚁 *C. mutilarius*)+窄颈弓背蚁血色亚种 *C. angusticollis* subsp. *sanguinolentus*))))))。但两种建树方法所得的系统发育树拓扑结构略有不同, 日本弓背蚁 *C. japonicus*、少毛弓背蚁 *C. spanis*、平和弓背蚁 *C. mitis* 和未知种 *Camponotus* sp.2 的进化地位需要进一步探讨。多刺蚁属 11 种的系统发育关系为 ((结多刺蚁 *P. rastellata*+短胸多刺蚁 *P. brevicorpa*)+双齿多刺蚁 *P. dives*+ (光亮多刺蚁 *P. lucidula*+ (江华多刺蚁 *P. jianghuaensis*+光胫多刺蚁 *P. tibialis*)+叶形多刺蚁 *P. lamellidens*+ (亚毛多刺蚁 *P. subpilosa*+哈氏多刺蚁 *P. halidayi*)+ (梅氏多刺蚁 *P. illaudata*+拟梅氏多刺蚁 *P. proxima*))))), 但两种方法的系统发育树拓扑结构也略有不同, 双齿多刺蚁 *P. dives* 和光亮多刺蚁 *P. lucidula* 的进化地位需要进一步探讨。【结论】由于弓背蚁族昆虫种间具有较为相似的形态特征, 很难通过传统的形态分类手段对其进行准确地分类, 分子特征可以作为其分类鉴定有效的辅助工具。

关键词 弓背蚁族; 线粒体 CO I 基因; 系统发育

Phylogenetic study of the Camponotini (Hymenoptera: Formicidae) based on mitochondrial CO I gene variation

LI Wen-Jie^{1,2**} CHEN Zhi-Lin^{1,2} ZHOU Shan-Yi^{1,2***}

(1. Key Laboratory of Ecology of Rare and Endangered Species and Environmental Protection (Guangxi Normal University), Ministry of Education, Guilin 541004, China; 2. College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

Abstract 【Objectives】To apply molecular methods to the identification of the Chinese Camponotini, the largest family in the Formicinae, and thereby contribute to a more complete understanding of the phylogenetic relationships among the Formicidae. 【Methods】A combination of traditional morphological classification methods and molecular methods were used. PCR amplification and sequencing of the mitochondrial CO I gene sequences of 24 species of 234 Camponotini species was carried out after which the phylogenetic relationships of some species were reconstructed using Bayesian (BI) and maximum likelihood (ML) methods. 【Results】(1) A total of 13 species clustered on a single branch, which is basically consistent with

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金项目 (31672343)

**第一作者 First author, E-mail: 18404906137@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: syzhou5849192@163.com

收稿日期 Received: 2021-11-02; 接受日期 Accepted: 2022-08-05

the results of morphological identification. (2) A more reliable phylogenetic relationship among the 11 species in the genus *Camponotus* is ((*C. japonicus*+*C. spanis*+*C. fuscivillosus* + unknown species *Camponotus* sp.1 + (*C. mitis*+ (*C. quadrinotatus* + *C. nicobarensis*) +*C. dolendus*+ (*C. wasmanni*+*C. mutilarius*) +*C. angusticollis* subsp. *Sanguinolentus*)))))). However, comparison of two phylogenetic tree topologies indicates that the phylogenetic relationships among *C. japonicus*, *C. spanis*, *C. mitis* and *Camponotus* sp.2 need further clarification. (3) A more reliable phylogenetic relationship of the 11 species in the genus *Polyrhachis* is ((*P. rastellata* + *P. brevicorpa*)+*P. dive* + (*P. lucidula*+ (*P. jianghuaensis*+*P. tibialis*) +*P. lamellidens*+ (*P. subpilosa* + *P. halidayi*) + (*P. illaudata* +*P. proxima*)))))). However, differences in the phylogenetic tree topologies obtained using the two methods indicate that the phylogenetic relationship between *P. dives* and *P. lucidula* require further clarification.

[Conclusion] Molecular methods are an effective auxiliary tool for identifying species of Camponotini, which are difficult to identify accurately with traditional morphological methods.

Key words Camponotini; mtCO I gene; phylogenetic

弓背蚁族 Camponotini 是蚁亚科 Formicinae 中最大的一个族,全世界已知 8 属 2 470 种 (Bolton, 2018)。该族分布广泛,是热带雨林生物多样性和生物量的重要组成部分,在陆地生态系统中占据着重要地位 (Wilson and Holldobler, 2005)。

弓背蚁族在我国主要包括弓背蚁属 *Camponotus* 和多刺蚁属 *Polyrhachis*。弓背蚁属是蚁科第一大属,全世界已描述 1 496 种 (Bolton, 2018)。此属存在多型现象,地理变异及种间差别微小,尚无人对该属进行全面系统的研究报道 (Tan, 2008)。Wheeler (1927)、Santschi (1925) 及 Forel (1912a) 等外国学者曾对我国弓背蚁属做过分类研究,共报道了 14 种及许多种下种。在国内,王常禄等 (1989) 对中国弓背蚁属进行过研究,共报道了 32 种,其中 10 种为新种,4 种为新地位种,4 种为中国新记录种。多刺蚁属是蚁科中的第二大属,全世界已描述 782 种 (Bolton, 2018),主要分布于非洲、亚洲、澳洲及大洋洲。Forel (1912b)、Santschi (1928) 及 Wheeler (1909) 等外国学者曾对我国多刺蚁属进行过分类研究,共报道了 12 种,5 变种或亚种。在国内,王常禄和吴坚 (1991) 对中国多刺蚁属进行过研究,共报道了 15 种,其中 3 新种,2 新地位种,5 中国新记录种。目前,中国弓背蚁族蚂蚁的部分种类已被进行了一定的研究,但还有许多新种有待描述,许多同物异名种类有待澄清,以及其全面系统的系统发育关系还有待研究。

线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 具有严格的母系遗传,进化速率较核 DNA 快,

常在物种存在时间内形成可用于系统发育分析的性状状态 (张亚平和施立明, 1992)。基于此,近年来提出了 DNA 条形码 (DNA barcoding) ——一种能快速区分和鉴定物种的方法,它可以满足对地球上几乎所有物种进行快速辨别的需要。国外学者应用分子标记在蚁科昆虫的分类、进化、分子系统发育和行为等方面做了一些工作 (Ayala et al., 1996; Heinze et al., 2000, 2005),但是国内在蚁科昆虫分子系统学方面的研究还不多。弓背蚁属的工蚁具有多型性,种与种之间区别细微,给分类工作者带来较大的困难。Brady 等 (2000) 对弓背蚁属 32 种 mtDNA 的 CO I 基因进行测序,利用分子数据探讨了弓背蚁属是否单系群及属内各亚属是否单系群等问题。庞广福 (2006) 对弓背蚁属部分种进行了基因序列分析。国外学者曾对多刺蚁属 60 多种进行过序列分析,主要集中在核糖体 18S、28S rRNA 基因与线粒体蛋白质编码区基因的研究上 (Rebecca et al., 2003; Andrew et al., 2005),其中 Brady 等 (2000) 对多刺蚁属 *Polyrhachis* 6 种 mtDNA 的 CO I 基因进行了测序。林端等 (2009) 对多刺蚁属 9 种的 Cyt b 基因进行过初步的分子系统学研究。但中国弓背蚁族蚂蚁部分种类的分类地位还需要进一步探究,且对中国弓背蚁族蚂蚁较全面的系统发育研究还鲜有报道。

本研究对弓背蚁族 234 头 24 种蚂蚁的 CO I 基因序列进行了 PCR 扩增和测序,并对其序列进行分析,重建弓背蚁族部分种类的系统发育关系,旨在为建立中国弓背蚁族分子鉴定系统以及蚁科的系统发育关系提供数据。

1 材料与方法

1.1 标本来源

本研究所用标本来自珍稀濒危动植物生态

与环境保护教育部重点实验室收藏的标本和作者野外考察采集的标本。共选取 25 种 236 头蚂蚁, 其中包括 1 种外群标本进行分析, 标本信息详见表 1。

表 1 研究标本信息
Table 1 Experimental specimen information

种名 Species	采集地点 Collect places	采集时间 Collection time	样品数 Sample numbers	序列登录号 GenBank accession no.
哀弓背蚁 <i>Camponotus dolendus</i>	广西大明山	2012.07.26	1	OM420287
	Daming mountain, Guangxi			
	广西龙州弄岗站	2012.07.11	1	OM420287
	Guangxi Longzhou Nonggang station			
	广西龙州三联保护站	2013.07.16	1	OM420287
	Guangxi Longzhou Sanlian protection station			
	广西龙州弄岗站	2013.07.10	1	OM420287
	Guangxi Longzhou Nonggang station			
	广西大明山	2011.05.26	1	OM420287
	Daming mountain, Guangxi			
	广西崇左	2016.06.13	1	OM420287
	Guangxi Chongzuo			
	广西崇左左州排汝屯	2016.06.13	1	OM420287
	Chongzuo Pairu village, Guangxi			
广布弓背蚁 <i>Camponotus herculeanus</i>	山西宁武县	2012.07.20	1	OM420290
	Ningwu county, Shanxi province			
	山西沁源县灵空山	2013.07.25	1	OM420290
	Lingkong mountain, Qinyuan county, Shanxi			
褐毛弓背蚁 <i>Camponotus fuscivillosus</i>	湖南九嶷山保护区	2019.08.05	1	OM420288
	Jiuyi mountain reserve, Hunan province			
	湖南莽山茶王谷	2019.07.31	4	OM420288
	Chawang valley in Boa mountain, Hunan			
	湖南江永都庞岭	2019.08.11	10	OM420288
	Dupang mountain, Jiangyong county, Hunan			
	浙江天目山	2011.06.06	1	OM420288
	Tianmu mountain, Zhejiang province			
日本弓背蚁 <i>Camponotus japonicus</i>	吉林临江	2012.07.30	1	OM420289
	Lin river, Jilin province			
	辽宁	2012.07.29	1	OM420289
	Liaoning province			
	内蒙科尔沁右翼嘎利	2012.07.27	1	OM420289
	Horqin right wing Ga Li, Inner Mongolia			
	河北遵化市清东陵	2012.08.02	1	OM420289
	Qingdong tomb in Zunhua city, Hebei province			
	河北平泉县	2012.08.04	1	OM420289
	Pingquan county, Hebei province			

续表 1 (Table 1 continued)

种名 Species	采集地点 Collect places	采集时间 Collection time	样品数 Sample numbers	序列登录号 GenBank accession no.
	山西宁武县 Ningwu county, Shanxi province	2012.08.01	1	OM420289
	浙江清凉峰龙 Qingliang peak Longtang temple, Zhejiang province	2012.06.27	1	OM420289
	浙江清凉峰 Qingliang peak, Zhejiang province	2012.06.27	1	OM420289
	河北阜平县天生桥 Tiansheng bridge, Fuping county, Hebei province	2013.07.15	1	OM420289
	河北灵寿县 Lingshou county, Hebei province	2013.07.18	1	OM420289
	河北赞皇县 Zanhuang county, Hebei province	2013.07.16	1	OM420289
	河北井陉市苍岩山 Cangyan mountain, Jingxing, Hebei province	2013.07.13	1	OM420289
	山西平定县 Pingding county, Shanxi province	2013.07.22	1	OM420289
	山西陵川县王莽岭 Wangmang ridge, Lingchuan county, Shanxi province	2013.07.23	1	OM420289
	山西阳城县 Yangcheng county, Shanxi province	2013.07.21	1	OM420289
	山西五台县红岩村 Hongyan village, Wutai county, Shanxi province	2013.07.24	1	OM420289
	山西沁源县灵空山 Lingkong mountain, Qinyuan county, Shanxi	2013.07.25	1	OM420289
	黄冈罗田青苔关 Luotian moss pass, Huanggang	2013.06.26	1	OM420289
	重庆汪津 Wangjin, Chongqing	—	1	OM420289
	湖南九嶷山保护区 Jiuyi mountain reserve, Hunan province	2019.08.03	2	OM420289
	福建武夷山桐木村 Tongmu village, Wuyi mountain, Fujian province	2019.08.05	1	OM420289
沃斯曼弓背蚁 <i>Camponotus wasmanni</i>	广西大明山 Daming mountain, Guangxi	2012.05.27	1	OM420291
尼科巴弓背蚁 <i>Camponotus nicobarensis</i>	广西防城东兴峒中板八村 Tongzhong Banba village, Fangchenggang city, Guangxi province	2015.07.22	1	OM420292
	广西龙州 Longzhou, Guangxi province	2013.07.16	1	OM420292
	金秀罗汉山保护区 Luohan mountain conservation area, Jinxiu	2014.07.12	1	OM420292

续表 1 (Table 1 continued)

种名 Species	采集地点 Collect places	采集时间 Collection time	样品数 Sample numbers	序列登录号 GenBank accession no.
	广西大明山山脚村子 Village at the foot of Daming mountain, Guangxi province	2012.04.18	1	OM420292
	广西防城上思平江 Siping river in Fangcheng, Guangxi	2013.07.17	1	OM420292
	广西崇左左州排汝屯 Chongzuo Pairu village, Guangxi province	2016.06.13	1	OM420292
	广西防城港十万大山 Shiwan mountain , Fangchenggang, Guangxi	2014.07.13	1	OM420292
	海南琼中县黎母山 Limu mountain in Qiongzong county, Hainan province	2016.04.03	1	OM420292
	海南五指山蝴蝶牧场 Wuzhi mountain butterfly ranch, Hainan	2016.04.05	1	OM420292
	西藏墨脱县背崩 Back collapse in Motuo county, Tibet	2016.07.26	1	OM420292
	湖南江永都庞岭 Dupang mountain, Jiangyong county, Hunan	2019.08.11	5	OM420292
四斑弓背蚁 <i>Camponotus quadrinotatus</i>	广西桂林 Guilin, Guangxi	2013.07.12	1	
少毛弓背蚁 <i>Camponotus spanis</i>	福州闽清县汤下村 Tangxia village, Minqing county, Fuzhou	2019.08.10	2	OM420293
	山西左权县龙泉国家森林公园 Longquan national forest park in Zuoquan county, Shanxi	2013.07.25	1	OM420293
	湖南莽山鬼子寨 Devil village in Boa mountain, Hunan	2019.07.27	1	OM420293
	湖南莽山相思坑 Acacia Pit in Boa mountain, Hunan	2019.07.30	2	OM420293
	湖南九嶷山寻龙谷 Dragon valley in Jiuyi mountain, Hunan	2019.08.03	2	OM420293
	湖南九嶷山保护区 Jiuyi mountain reserve, Hunan	2019.08.04	5	OM420293
	湖南阳明山保护区 Yangmingshan protected area, Hunan	2019.08.22	3	OM420293
截胸弓背蚁 <i>Camponotus mutilarius</i>	广西隆林金钟山保护区松树林 Pine forest in Jinzhong mountain reserve, Longlin, Guangxi	2014.07.18	1	OM420294
平和弓背蚁 <i>Camponotus mitis</i>	广西隆林金钟山保护区 Jinzhong mountain reserve in Longlin, Guangxi	2014.07.17	1	OM420286
	湖南九嶷山保护区 Jiuyi mountain conservation area, Hunan	2019.08.04	1	OM420286
	湖南阳明山保护区 Yangmingshan conservation area, Hunan	2019.08.22	2	OM420286

续表 1 (Table 1 continued)

种名 Species	采集地点 Collect places	采集时间 Collection time	样品数 Sample numbers	序列登录号 GenBank accession no.
	广西大明山三宝 Sanbao in daming mountain , Guangxi	2011.05.21	1	OM420286
	广西花坪 Huaping, Guangxi	2010.07.25	1	OM420286
	浙江天目山 Tianmu mountain in Zhejiang province	2011.07.27	1	OM420286
	广西师大雁山校区 Yanshan campus of Guangxi normal university	2019.05.21	1	OM420286
	广西岑王老山达龙坪 Cengwanglao mountain in Dalongping, Guangxi	2014.07.28	1	OM420286
	金秀莲花山保护区 Lianhua mountain conservation area in Jinxiu	2014.07.15	1	OM420286
	广西防城港十万大山 Shiwan mountain in Fangchenggang , Guangxi	2014.07.13	1	OM420286
	广西大明山林道 Forest road in Daming mountain, Guangxi	2012.04.21	1	OM420286
	广西大明山山脚村子 Village at the foot of Daming mountain, Guangxi province	2012.04.17	1	OM420286
	江西广丰县铜钹山 Tongba mountain in Guangfeng county, Jiangxi province	2012.09.02	1	OM420286
	广西崇左左州排汝屯 Chongzuo Pairu village, Guangxi province	2016.06.13	1	OM420286
	海南琼中县黎母山 Limu mountain in Qiongzong county, Hainan province	2016.04.03	1	OM420286
	海南乐东县县尖峰岭 Jianfeng mountain Ledong county, Hainan	2016.04.07	1	OM420286
	黄冈英山桃花冲 Peach blossom in Ying mountain, Huanggang	2013.06.27	1	OM420286
	海南东方市白查村 Bai Cha village, Dongfang, Hainan province	2016.04.11	1	OM420286
	三明市龙栖山仙人掌 Longqi mountain fairy hall, Sanming	2019.08.22	1	OM420286
窄颈弓背蚁血色亚种 <i>Camponotus angusticollis</i> subsp. <i>sanguinolentus</i>	西藏墨脱至背崩路口 Motuo to back collapse road, Tibet	2016.07.26	1	OM420295
	西藏墨脱县后山 Back hill in Motuo county, Tibet	2016.07.24	1	OM420295
未知种 Unknown species <i>Camponotus</i> sp.1	海南乐东县县尖峰岭 Jianfeng mountain Ledong county, Hainan	2016.04.07	1	
未知种 Unknown species <i>Camponotus</i> sp.2	广西大明山四天平 Sitianping in Daming mountain Guangxi	2011.05.22	1	

续表 1 (Table 1 continued)

种名 Species	采集地点 Collect places	采集时间 Collection time	样品数 Sample numbers	序列登录号 GenBank accession no.
短胸多刺蚁 <i>Polyrhachis brevicorpa</i>	云南 Yunnan province	—	1	OM420296
	云南 Yunnan province	—	1	OM420296
双齿多刺蚁 <i>Polyrhachis dives</i>	广西隆林金钟山保护区 Jinzhong mountain reserve in Longlin, Guangxi	2014.08.06	1	OM420297
	广西大明山 Daming mountain, Guangxi	2012.05.23	2	OM420297
	江西广丰县 Guangfeng county, Jiangxi province	2012.07.20	1	OM420297
	广西龙州弄强三卡 Longzhou Nongqiang three card, Guangxi	2013.07.26	1	OM420297
	广西岑王老山保护区 Cengwanglao mountain protected area, Guangxi	2014.08.01	3	OM420297
	贵州荔波翁昂路线二 Libo wengang route two, Guizhou	2015.07.02	1	OM420297
	古田会址彩眉 Caimeiao in Gutian meeting site	2019.08.15	1	OM420297
	福建黄褚林海洋村 Haiyang village in Huangchu forest , Fujian	2019.08.17	1	OM420297
	广西大明山九公里林道右深入 3 km Daming mountain 9 km forest road deep right 3 km, Guangxi	2012.07.09	1	OM420298
	浙江清凉峰顺溪坞 Shunxiwu in Qingliang peak, Zhejiang	2012.07.25	1	OM420298
梅氏多刺蚁 <i>Polyrhachis illaudata</i>	桂林尧山 Yao mountain, Guilin	2012.06.11	1	OM420298
	江西广丰云光寺周边 Around Yunguang temple in Guangfeng, Jiangxi	2012.07.19	1	OM420298
	黄冈英山桃花冲 Peach blossom in Ying mountain, Huanggang	2012.06.27	1	OM420298
	广西大明山 Daming mountain, Guangxi	2012.07.08	1	OM420298
	广西大明山北仓口 Beichangkou, Daming mountain, Guangxi	2012.07.08	1	OM420298
	广西大明山龙母庙 Dragon mother temple in Daming mountain, Guangxi	2012.07.10	1	OM420298
	金秀莲花山保护区 Lianhua mountain conservation area in Jinxiu	2014.07.14	1	OM420298
	金秀罗汉山保护区 Luohan mountain conservation area in Jinxiu	2014.07.12	1	OM420298
	金秀银杉保护区 Silver fir conservation area in Jinxiu	2014.07.11	1	OM420298

续表 1 (Table 1 continued)

种名 Species	采集地点 Collect places	采集时间 Collection time	样品数 Sample numbers	序列登录号 GenBank accession no.
哈氏多刺蚁 <i>Polyrhachis halidayi</i>	金秀长滩河保护区 Changtan river conservation area in Jinxiu	2014.07.16	1	OM420298
	贵州荔波翁昂路线二 Libo wengang route two, Guizhou	2015.07.02	1	OM420298
	海南琼中县黎母山 Limu mountain in Qiongzong county, Hainan province	2016.04.03	1	OM420298
	海南乐东县县尖峰岭 Jianfeng mountain Ledong county, Hainan	2016.04.07	1	OM420298
	西藏墨脱至背崩路口 Motuo to back collapse road, Tibet	2016.07.26	1	OM420298
	西藏墨脱县背崩 Back collapse in Motuo, Tibet	2016.07.28	1	OM420298
	西藏波密脱县易 Yigong, Bomit county, Tibet	2016.07.28	1	OM420298
	广西崇左 Chongzuo, Guangxi	2016.06.13	1	OM420298
	湖南江永都庞岭 Dupang mountain, Jiangyong county, Hunan	2019.08.11	3	OM420298
	湖南莽山茶王谷 Chawang valley in Boa mountain, Hunan	2019.07.31	1	OM420298
	湖南九嶷山保护区 Jiuyi mountain conservation area, Hunan	2019.08.04	1	OM420298
	湖南都庞岭月岩站 Dupangling yueyan station, Hunan	2019.08.13	2	OM420298
	福州闽清县汤下村 Tangxia village, Minqing county, Fuzhou	2019.08.10	1	OM420298
	三明市龙栖山仙人堂 Longqi mountain fairy hall, Sanming	2019.08.22	1	OM420298
	武夷山桐木村七里桥 Qili bridge, Tongmu village, Wuyi mountain	2019.08.03	1	OM420298
	云南版纳 Banna Yunnan	—	1	OM420298
	广西大明山下水源村 Shuiyuan village, Daming mountain, Guangxi	2012.05.03	1	OM420299
	金秀莲花山保护区 Lianhua mountain conservation area in Jinxiu	2014.07.14	1	OM420299
	金秀罗汉山保护区 Luohan mountain conservation area in Jinxiu	2014.07.12	1	OM420299
	广西防城港十万大山 Shiwan mountain in Fangchenggang, Guangxi	2014.06.24	1	OM420299
	海南乐东县县尖峰岭 Jianfeng mountain Ledong county, Hainan	2016.04.07	1	OM420299

续表 1 (Table 1 continued)

种名 Species	采集地点 Collect places	采集时间 Collection time	样品数 Sample numbers	序列登录号 GenBank accession no.
叶形多刺蚁 <i>Polyrhachis lamellidens</i>	海南五指山蝴蝶牧场 Butterfly ranch in Wuzhi mountain, Hainan	2016.04.05	1	OM420299
	河南林州市 Linzhou, Henan province	2013.07.29	1	OM420300
	金秀长滩河保护区 Changtan river conservation area in Jinxiu	2014.07.15	1	OM420300
光胫多刺蚁 <i>Polyrhachis tibialis</i>	广西防城港十万大山 Shiwan mountain in Fangchenggang , Guangxi	2014.06.22	1	OM420301
光亮多刺蚁 <i>Polyrhachis lucidula</i>	广西崇左左州排汝屯 Chongzuo Pairu village, Guangxi province	2016.06.15	1	OM420302
结多刺蚁 <i>Polyrhachis rastellata</i>	海南琼中县黎母山 Limu mountain in Qiongzong county, Hainan province	2016.04.03	1	OM420303
江华多刺蚁 <i>Polyrhachis jianghuaensis</i>	海南乐东县县尖峰岭 Jianfeng mountain Ledong county, Hainan	2016.04.09	1	OM420304
亚毛多刺蚁 <i>Polyrhachis subpilosa</i>	海南霸王岭雅加林场 Bawangling Yajia forest farm, Hainan	2016.04.12	1	OM420304
	西藏墨脱至背崩路口 Motuo to back collapse road, Tibet	2016.07.28	1	OM420304
	云南 Yunnan province	—	1	OM420304
	福州闽清县汤下村 Tangxia village, Minqing county, Fuzhou	2019.08.10	1	OM420305
	福建黄褚林海洋村 Haiyang village in Huangchu forest , Fujian	2019.08.17	1	OM420306
拟梅氏多刺蚁 <i>Polyrhachis proxima</i>	湖南江永都庞岭 Dupang mountain, Jiangyong county, Hunan	2019.08.12	1	OM420306
日本黑褐蚁 <i>Formica japonica</i>	外群 Outgroup			

—表示因年代久远或未及时系统整理标本，暂缺标本信息。
— means species information that is temporarily missing due to a long time or failure to systematically organize species in time.

1.2 实验方法

1.2.1 总 DNA 提取 采用 DNeasy 试剂盒抽提法来提取蚂蚁组织的总 DNA。实验开始前，手术剪刀、尖头镊子、圆形滤纸、离心管等实验器具均在高压蒸汽灭菌锅中进行灭菌，同时在真空干燥箱中干燥。将收集到离心管中的样品溶液保存在 - 20 ℃ 的冰箱中。

1.2.2 PCR 扩增与检测 本研究采用通用引物 LCO1490（序列 5'→3'：GGTCAACAAACA-TAAAGATATTGG）、HCO2198（序列 5'→3'：

TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA）对 CO I 片段进行扩增（Folmer *et al.*，1994），引物由北京擎科生物科技有限公司合成。将 10 μL 引物原液和 90 μL ddH₂O 混匀后保存于 4 ℃ 冰箱中，待用。

PCR 扩增反应的体系为 50 μL 体系，体系中原料、模板、引物及 DNA 聚合酶等各种成分的配比如下：（1）2×Taq MasterMix（含染料）25 μL；（2）上下游引物各 2 μL；（3）目的基因组 DNA（模板）4 μL；（4）无菌双蒸水 17 μL。将各种成分混匀在高速台式离心机中以 8 000 r/min 的

速度离心后放入 PCR 扩增仪中进行 PCR 扩增反应。

PCR 扩增反应的条件及阶段如下：95 ℃预变性 5 min 阶段；35 次循环扩增阶段，包括 94 ℃变性 45 s，48 ℃退火 45 s，70 ℃延伸 90 s；最后的 72 ℃延伸 10 min 阶段。反应结束后，将样品于 4 ℃保存。扩增产物通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 PCR 产物纯化与测序 经 1%的琼脂糖凝胶电泳检测后得到条带单一且明亮的 PCR 产物之后，送北京擎科生物科技有限公司（广州测序部）对其进行 DNA 双向测序。对于条带单一或者较淡的产物，则使用 DNA 胶回收试剂盒对其进行纯化回收。

1.3 数据处理及分析

将双向测序成功的序列通过 DNASTAR 软件包中 SeqMan（Swindel and Plasterer, 1997）软件进行剪切和拼接，之后通过 MEGA7（Tamura et al., 2016）中的 ClustalW 进行多重序列的比对，并在 MEGA7 中对分组之后的基因片段数据进行保守位点（Conserved site）、变异位点（Variable site）、简约信息位点（Parsim-info site）、自裔位点（Singleton site）含量和碱基组成、遗传距离的计算，并对数据集进行系统发育信号检验。

本研究选取与弓背蚁族关系较近的日本黑褐蚁 *Formica japonica*（蚁亚科 Formicinae、蚁

属 *Formica*）作为外群，通过 Phylosuite 软件构建 BI 树和 ML 树。

（1）贝叶斯系统发育推论法构建 BI 树：将比对完成的序列数据导入 Phylosuite 软件中，经过核苷酸替换模型选择之后，通过其中的 MrBayes（Ronquist and Huelsenbeck, 2003）插件进行 BI 法建树。对 MCMC 变量设置如下：运行 1 000 000 代；每 100 代进行一次抽样获得系统树的支系结构及其后验概率；运行 4 条马尔科夫链；Burnin 值设置为 2 500。

（2）最大似然法构建 ML 树：将比对完的序列直接导入 Phylosuite 软件的 IQ-TREE 插件中进行 ML 法建树。由于 IQ-TREE 自带选模型然后建树功能，因此可以省去单独选模型的步骤。模型选择 Auto，即先选择最优模型，然后根据选择的最优模型建树；选上+R，计算 FreeRate 模型；选用标准的 bootstrap 方法。

2 结果与分析

2.1 序列组成特征

对弓背蚁族 24 种昆虫的 CO I 基因序列组成进行统计分析，得到的结果如表 2 所示。

由表 2 可知，CO I 基因片段长度为 658 bp，保守位点（Conserved）有 145 个，占总位点数的 22.04%；变异位点（Variable）有 513 个，占总位点数的 77.96%；简约信息位点（Parsim-info）有 504 个，占总位点数的 76.60%；自裔位点

表 2 弓背蚁族 24 种昆虫的 CO I 基因片段组成分析
Table 2 Composition analysis of CO I gene fragments of 24 species of camponotini

位点 Positions	长度 (bp) Length (bp)	C	V	Pi	S	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)	(A+T) (%)	(G+C) (%)
总片段 All fragment	658	145	513	504	9	29.9	13.3	37.2	19.5	67.1	32.8
第一位点 The first site	221					29	8.0	42.7	20.7	71.7	28.7
第二位点 The second site	220					26	17.5	34.5	21.8	60.5	39.3
第三位点 The third site	218					35	14.5	34.5	16.1	69.5	30.6

C: 保守位点；V: 变异位点；Pi: 简约信息位点；S: 自裔位点。
C: Conserved; V: Variable; Pi: Parsim-info; S: Singleton.

(Singleton) 有 9 个, 占总位点数的 1.37%。

CO I 基因序列中, 碱基 T、C、A 和 G 的组成总平均含量分别为 29.93%、13.31%、37.24% 和 19.52%, A+T 的平均含量为 67.17%, G+C 的平均含量为 32.83%。其中第一位点 A+T 的平均含量为 71.41%, G+C 的平均含量为 28.59%, 第二位点 A+T 的平均含量为 60.62%, G+C 的平均含量为 39.38%, 第三位点 A+T 和 G+C 的平均含量分别为 69.43% 和 30.57%。

以上结果表明, 线粒体的 CO I 基因具有明显的 A/T 偏向性。而且, 通过碱基变异频率可以看出, CO I 基因片段的变异位点占比较高, 这一特点使 CO I 基因片段常常可以用来区分相近或相似的种类。

2.2 系统发育信号检验

以 P-distance(转换+颠换)为横轴, 转换(Ts)和颠换(Tv)值为纵轴作图, 对序列碱基替换饱和度进行评估, 判断是否适用于系统发育分析(图 1)。结果表明转换和颠换与 P-distance 呈明显的线性关系, 碱基替换仍有一定的上升趋势, 说明基因没有达到饱和状态, 可以用于系统发育分析。

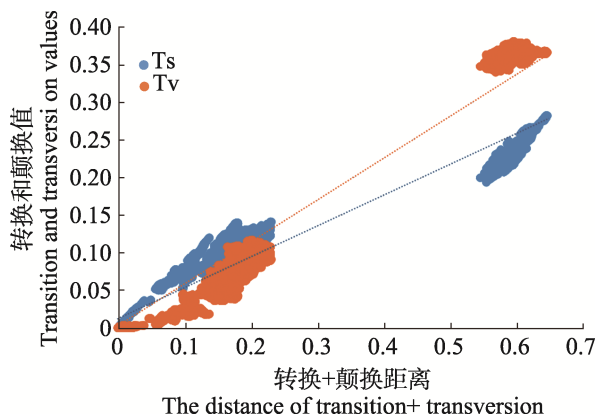


图 1 碱基替换饱和性分析

Fig. 1 Saturation analysis of base substitution

Ts: 转换值 Transition values;

Tv: 颠换值 Transversion values.

2.3 系统发育分析

采用贝叶斯推论法 (Bayesian inference, BI)

和最大似然法 (Maximum likelihood, ML) 重建弓背蚁族部分种类的系统发育关系, 结果如图 2 和图 3 所示。2 种方法构建的系统发育树的拓扑结构基本一致, 考虑到形态鉴定误差, 可得出如下结果:

(1) 共有 13 个物种能够单独聚成一支, 分别是褐毛弓背蚁 *C. fuscivillosus*、平和弓背蚁 *C. mitis*、四斑弓背蚁 *C. quadrinotatus*、尼科巴弓背蚁 *C. nicobarensis*、哀弓背蚁 *C. dolendus*、窄颈弓背蚁血色亚种 *C. angusticollis* subsp. *sanguinolentus*、未知种 *Camponotus* sp.1、短胸多刺蚁 *P. brevicorpa*、双齿多刺蚁 *P. dives*、江华多刺蚁 *P. jianghuaensis*、叶形多刺蚁 *P. lamellidens*、哈氏多刺蚁 *P. halidayi* 和梅氏多刺蚁 *P. illaudata*。这与形态鉴定的结果基本一致。

(2) 弓背蚁属 11 种昆虫较为可靠的系统发育关系为: (日本弓背蚁 *C. japonicus*+少毛弓背蚁 *C. spanis*+褐毛弓背蚁 *C. fuscivillosus*+未知种 *Camponotus* sp.1+(平和弓背蚁 *C. mitis*+(四斑弓背蚁 *C. quadrinotatus*+尼科巴弓背蚁 *C. nicobarensis*)+哀弓背蚁 *C. dolendus*+(沃斯曼弓背蚁 *C. wasmanni*+截胸弓背蚁 *C. mutillarius*)+窄颈弓背蚁血色亚种 *C. angusticollis* subsp. *sanguinolentus*))))), 但通过两种系统发育树拓扑结构的对比来看, 日本弓背蚁 *C. japonicus*, 少毛弓背蚁 *C. spanis*, 平和弓背蚁 *C. mitis* 和未知种 *Camponotus* sp.2 的进化地位需要进一步探讨。

(3) 多刺蚁属 11 种昆虫较为可靠的系统发育关系为: ((结多刺蚁 *P. rastellata*+短胸多刺蚁 *P. brevicorpa*)+双齿多刺蚁 *P. dives*+(光亮多刺蚁 *P. lucidula*+(江华多刺蚁 *P. jianghuaensis*+光胫多刺蚁 *P. tibialis*)+叶形多刺蚁 *P. lamellidens*+(亚毛多刺蚁 *P. subpilosa*+哈氏多刺蚁 *P. halidayi*)+(梅氏多刺蚁 *P. illaudata*+拟梅氏多刺蚁 *P. proxima*))))), 但两种方法的系统发育树拓扑结构稍微不同, 反映出双齿多刺蚁 *P. dives* 和光亮多刺蚁 *P. lucidula* 的进化地位仍需进一步探讨。



3 讨论

通过分子手段和形态比较,对弓背蚁属部分种类的种间关系进行了研究,结果表明,尼科巴弓背蚁和日本弓背蚁的关系较近;少毛弓背蚁和平和弓背蚁的关系较近。通过与本研究的结果进行对比,表明日本弓背蚁、少毛弓背蚁和平和弓背蚁的进化地位需要进一步探讨。相对而言,基于 mini-DNA 条形码序列构建的系统发育树,则会出现较多的同种的多系分支和不同种的分支重叠现象 (Hajibabaei *et al.*, 2006)。林嫦 (2009a)

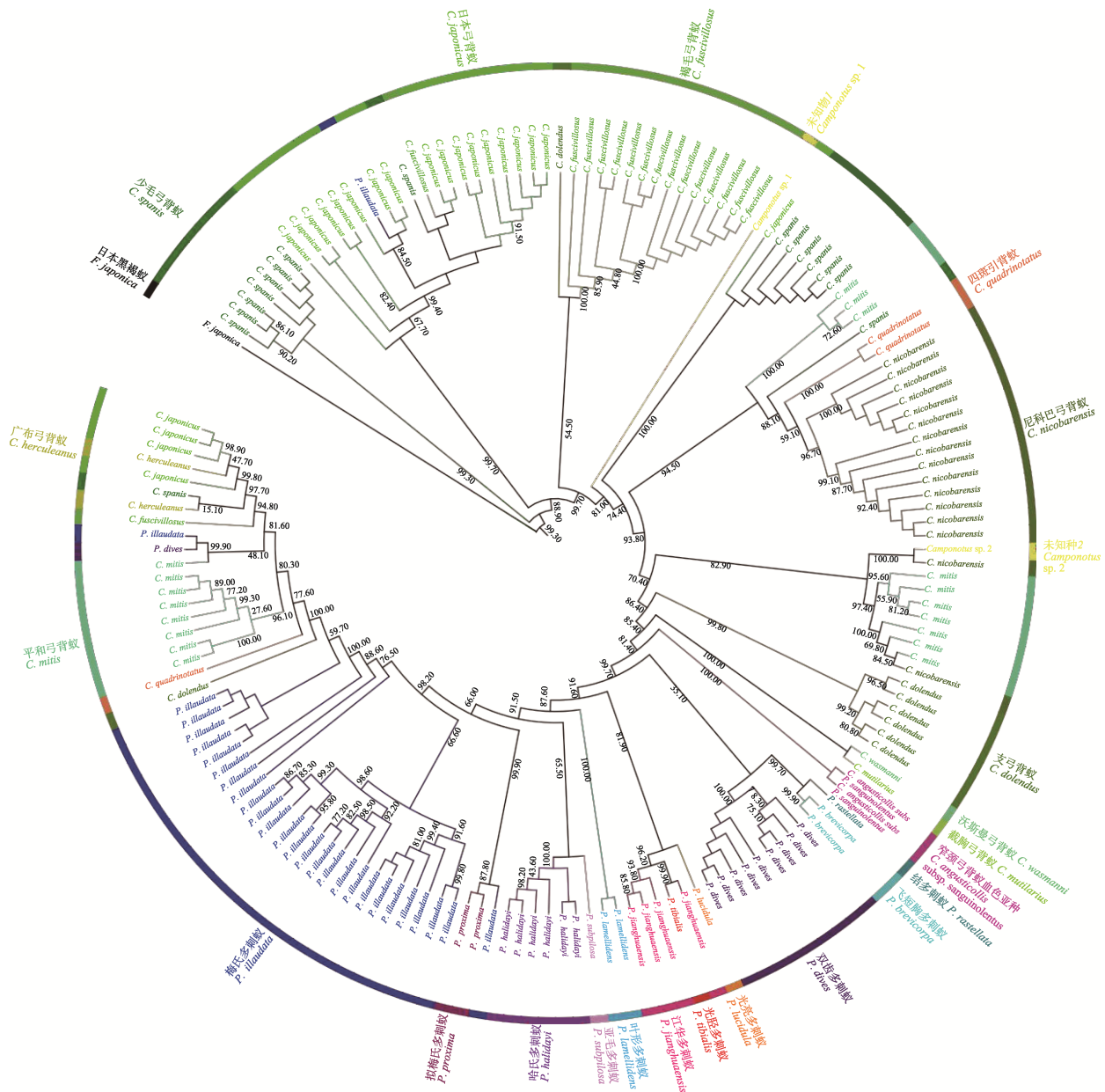


图 3 基于最大似然法 CO I 基因的系统发育树 (ML)

Fig. 3 The phylogenetic tree of CO I gene based on ML phylogenetic analyses

和林端等 (2009b) 对多刺蚁属进行了分子系统学研究, 得出多刺蚁属 10 种昆虫的系统发育关系为 (((亚毛多刺蚁+梅氏多刺蚁)+警觉多刺蚁+拟梅氏多刺蚁)+结多刺蚁+叶形多刺蚁+(麦多刺蚁+二色多刺蚁+双齿多刺蚁)+哈氏多刺蚁), 这与本研究的结果差异较大, 原因可能是其 CO I 序列长度仅为 174 bp, 建树结果不理想。

弓背蚁族昆虫的 CO I 基因序列中, A+T 的

含量为 67.17%, 其中第一位点 A+T 的含量为 71.41%, 第二位点 A+T 的含量为 60.62%, 第三位点 A+T 的含量为 69.43%, 说明线粒体的 CO I 基因具有明显的 A/T 偏向性, 与昆虫线粒体具有高 A、T 含量的特性一致 (Simon *et al.*, 1994; Hajibabaei *et al.*, 2006; 陈振鹏和周善义, 2007)。而且, 通过碱基变异频率可以看出, CO I 基因片段的变异位点占比较高, 这一特点使 CO I 基因片段常常可以用来区分相近或相似的种类, 并

构建它们较具参考价值的分子系统发育树。

综上所述,由于弓背蚁族昆虫种间具有较为相似的形态特征,很难通过传统的形态分类手段对其进行准确地分类。DNA 条形码可以作为分类鉴定的辅助工具,但需要考虑多种因素,如取样数量、取样范围及同种个体的基因多样性等,才能更好地利用线粒体 CO I 基因片段进行物种的系统发育树构建。在今后的研究中,应该增加种类和数量,使分类单元更加全面。同时,应选取尽可能多的有效的形态特征,采用多个核基因、线粒体基因等多个分子标记,将形态和分子特征结合起来,采用支序系统学等分析方法,构建更加科学、真实和符合自然发展规律的系统发育关系。

参考文献 (References)

- Beckenbach AT, Robson SKA, Crozier RH, 2005. Single nucleotide +1 frameshifts in an apparently functional mitochondrial cytochrome b gene in ants of the genus *Polyrhachis* *Molecular Evolution*, 60(2): 141–152.
- Ayala FJ, Wetterer JK, Longino JT, Hartl DL, 1996. Molecular phylogeny of azteca ants (Hymenoptera: Formicidae) and the colonization of cecropia trees. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5(2): 423–428.
- Bolton B, 2018. An online catalog of the ants of the world. Available from <http://antcat.org/> (Accessed 3 Mar. 2020)
- Brady SG, Gadau J, Ward PS, 2000. Systematics of the ant genus *Camponotus* (Hymenoptera: Formicidae): A preliminary analysis using data from the mitochondrial gene cytochrome oxidase I//Austin AD, Dowton M(eds.). Hymenoptera. Evolution, Biodiversity and Biological Control. Collingwood, Victoria: CSIRO Publishing. 131–139.
- Chen ZP, Zhou SY, 2007. Molecular systematic study on twelve species of seven genera in Myrmicinae (Hymenoptera: Formicidae) from Guangxi, South China. *Acta Entomologica Sinica*, 50(4): 395–404. [陈振鹏, 周善义, 2007. 切叶蚁亚科七属十二种的分子系统学研究. 昆虫学报, 50(4): 395–404.]
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5): 294–299.
- Forel H, 1912a. Sauter Formosa-Ausbeute Formicidae(Hym.). *Ent. Mitteil.*, 1: 67–81.
- Forel H, 1912b. Sauter Formosa-Ausbeute Formicidae (Hym.). *Ent. Mitteil.*, 1: 79–81.
- 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*, 103(4): 968–971.
- Heinze J, Strätz M, Pedersen JS, Haberl M, 2000. Microsatellite analysis suggests occasional worker reproduction in the monogynous ant *Crematogaster smithi*. *Insectes Sociaux*, 47(4): 299–301.
- Heinze J, Trindl A, Seifert B, 2005. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Mol. Phylogenic Evol.*, 37: 278.
- Lin E, 2009. Molecular systematic of the genus *Polyrhachis* (Hymenoptera: Formicidae). Master's thesis. Guilin: Guangxi Normal University. [林嫦, 2009. 多刺蚁属分子系统学研究. 硕士学位论文. 桂林: 广西师范大学.]
- Lin E, Zhou SY, Qin F, Yan XB, Fu WB, 2009. Molecular systematic of nine species of the genus *Polyrhachis* (Hymenoptera: Formicidae), based on mitochondrial cytochrome b gene sequences. *Genomics and Applied Biology*, 28(6): 1071–1080. [林嫦, 周善义, 秦峰, 颜杏冰, 付文博, 2009. 基于 Cytb 基因的九种多刺蚁(膜翅目: 蚁科) 的分子系统学. 基因组学与应用生物学, 28(6): 1071–1080.]
- Pang GF, 2006. Molecular systematic study on several species of *Camponotus* (Hymenoptera: Formicidae). Master's thesis. Guilin: Guangxi Normal University. [庞广福, 2006. 弓背蚁属部分种分子系统学研究. 硕士学位论文. 桂林: 广西师范大学.]
- Pang GF, Qin F, Zhou SY, Qin XM, 2009. Molecular phylogenetic research on some species of *Camponotus* (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Guangxi Normal University (Natural Science Edition)*, 27(3): 62–66. [庞广福, 秦峰, 周善义, 秦新民, 2009. 蚁科弓背蚁属部分种的分子系统学研究. 广西师范大学学报(自然科学版), 27(3): 62–66.]
- Johnson RN, Agapow PM, Crozier RH, 2003. A tree island approach to inferring phylogeny in the ant subfamily Formicinae, with especial reference to the evolution of weaving. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29: 317–330.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP, 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 19(12): 1572–1574.
- Santschi F, 1925. Contribution à la faune myrmécologique de la

- chine. *Bull. Soc. Vaud. Sc. Nat.*, 56: 81–96.
- Santschi F, 1928. Nouvelles fourmis de Chine et du Turkestan russe. *Bull. Soc. Vaud. Sc. Nat.*, 68: 39–40.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P, 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the entomological Society of America*, 87(6): 651–701.
- Swindel SR, Plasterer TN, 1997. Seqman. Sequence Data Analysis Guidebook. New York: Springer. 75–89.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 7.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8): 1596–1599.
- Tan Z, 2008. A taxonomy study on genes *Camponotus* from China (Hymenoptera: Formicidae: Formicinae). Master's thesis. Guilin: Guangxi Normal University. [谭钊, 2008. 中国弓背蚁属分类研究(膜翅目: 蚁科: 蚁亚科). 硕士学位论文. 桂林: 广西师范大学.]
- Wang CL, Wu J, 1991. A entomology study on genes *Polyrhachis* from China (Hymenoptera: Formicidae). *Forest Research*, 4(6): 596–601. [王常禄, 吴坚, 1991. 中国多刺蚁属(膜翅目: 蚁科)昆虫研究. 林业科学研究, 4(6): 596–601.]
- Wang CL, Xiao GR, Wu J, 1989. A entomology study on genes *Camponotus* from China (Hymenoptera: Formicidae). *Forest Research*, 2(3): 221–228. [王常禄, 萧刚柔, 吴坚, 1989. 中国弓背蚁属(膜翅目: 蚁科)昆虫研究. 林业科学研究, 2(3): 221–228.]
- Wheeler WM, 1909. XXIV-Ants of Formosa and the Philippines. *Amer. Mus. Nat. Hist. Bull.*, 26(5): 337–345.
- Wheeler WM, 1927. Chinese ants collected by professor S. F. Light and professor N. Gist Gee. *Amer. Mus. Nov.*, 225(51): 1–12.
- Wilson EO, Holldobler B, 2005. The rise of the ants: A phylogenetic and ecological explanation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(21): 7411–7414.
- Zhang YP, Shi LM, 1992. A survey of research on animal mitochondrial DNA polymorphism. *Zoological Research*, 13(3): 289–298. [张亚平, 施立明, 1992. 动物线粒体 DNA 多态性的研究概况. 动物学研究, 13(3): 289–298.]



点蜂缘蝽 *Riptortus pedestris* (Fabricius) 若虫

点蜂缘蝽是半翅目(Hemiptera)蛛缘蝽科(Alydidae)昆虫。点蜂缘蝽在全国广泛分布,喜欢刺吸危害豆科植物。点蜂缘蝽若虫有5个龄期,1-4龄若虫酷似蚂蚁。本期封面照片于2019年8月8日拍摄于北京市延庆区玉渡山。

(张润志, 中国科学院动物研究所)