

丝殊角萤叶甲的线粒体基因组测序 及系统发育分析*

林兴雨** 席玉强 尹新明*** 宋 南***

(河南农业大学植物保护学院, 河南绿色害虫防治国际实验室, 河南害虫生物防治工程实验室, 郑州 450002)

摘 要 【目的】为探究丝殊角萤叶甲 *Agetocera filicornis* (Laboissiere, 1927) 线粒体基因组结构特征及叶甲亚科的系统发育关系。【方法】利用高通量测序方法测定丝殊角萤叶甲线粒体基因组序列。选择叶甲亚科 Chrysomelinae 和萤叶甲亚科 Galerucinae 的 128 个物种作为内群, 选择肖叶甲亚科 Eumolpinae 的 3 个物种作为外群, 利用最大似然法和贝叶斯法重建叶甲亚科的系统发育关系。【结果】丝殊角萤叶甲的线粒体基因组全长为 15 814 bp, 包含 37 个基因 (13 个蛋白质编码基因、2 个核糖体 RNA 基因和 22 个转运 RNA 基因) 和一段非编码控制区。其线粒体基因组 AT 含量丰富 (76.6%), 并且 AT 偏斜为正值 (0.053), GC 偏斜为负值 (−0.252)。不同的系统发育分析方法构建的系统发育关系支持萤叶甲亚科为单系群, 叶甲亚科为非单系群。【结论】本研究首次获得了丝殊角萤叶甲的线粒体基因组全序列。构建了叶甲亚科的系统发育关系, 为更好地理解叶甲亚科、萤叶甲亚科和丝殊角萤叶甲的系统发育提供线粒体基因组数据。

关键词 鞘翅目; 叶甲亚科; 萤叶甲亚科; 丝殊角萤叶甲; 线粒体基因组; 系统发育

Mitochondrial genome sequencing of the *Agetocera filicornis* (Laboissiere, 1927) and phylogenetic analysis

LIN Xing-Yu** XI Yu-Qiang YIN Xin-Ming*** SONG Nan***

(Henan International Laboratory for Green Pest Control, Henan Engineering Laboratory of Pest Biological Control,
College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract 【Aim】To explore the structural characteristics of the mitochondrial genome of *Agetocera filicornis* (Laboissiere, 1927), and the phylogenetic relationships within the Chrysomelinae subfamily. 【Methods】The mitochondrial genome sequence of *A. filicornis* was determined using high-throughput sequencing methods. We selected 128 species from the subfamilies Chrysomelinae and Galerucinae as ingroups, and three species from the subfamily Eumolpinae as outgroups. The phylogenetic relationships within the Chrysomelinae Subfamily were reconstructed using maximum likelihood and Bayesian methods. 【Results】The mitochondrial genome of *A. filicornis* is 15 814 bp in length, containing 37 genes (13 protein-coding genes, 2 ribosomal RNA genes, and 22 transfer RNA genes) and a non-coding control region. The mitochondrial genome has a high AT content (76.6%) with a positive AT-skew (0.053) and a negative GC-skew (−0.252). Different phylogenetic analysis methods support Galerucinae as a monophyletic group and Chrysomelinae as a non-monophyletic group. 【Conclusion】This study reports, for the first time, the complete mitochondrial genome of *A. filicornis*. By constructing the phylogenetic relationships within Chrysomelinae, we provide new mitochondrial genomic data that will contribute to a better understanding of the phylogeny between Chrysomelinae, Galerucinae, and *A. filicornis*.

Key words Coleoptera; Chrysomelinae; Galerucinae; *Agetocera filicornis*; mitochondrial genome; phylogeny

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金项目 (U1904104); 国家现代农业体系研究项目 (CARS-27); 河南自然科学基金 (NO. 232300420010)

**第一作者 First author, E-mail: xingyulin666666@163.com

***共同通讯作者 Co-corresponding authors, E-mail: songnan@henau.edu.cn; xmyin@henau.edu.cn

收稿日期 Received: 2023-07-15; 接受日期 Accepted: 2023-10-26

叶甲科 Chrysomelidae 是鞘翅目 Coleoptera 中物种数量较为丰富的一个科, 全世界已描述物种大约有 40 000 种 (Crowson, 1955)。它们多数为植食性昆虫, 少数以取食蚁巢碎片等为食。叶甲科主要由 10 个亚科构成 (Gómez-Zurita *et al.*, 2008)。目前关于叶甲亚科的系统发育关系仍然存在不同意见, 例如一些研究结果支持叶甲亚科为单系群 (Duckett *et al.*, 2004; Farrell and Sequeira, 2004), 而一些系统发育结果不支持 (Gómez-Zurita *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2018; Nie *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2022)。线粒体基因组因其分子量小、便于组装以及母系遗传等独特的优势, 常被用于分子进化、种群遗传和系统发育等研究中 (Gillett *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2018; 林兴雨等, 2023, 2024; 林兴雨和宋南, 2023, 2024)。目前, 超过 260 条叶甲亚科的部分或完整的线粒体基因组序列已经被释放 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。获得更多物种的线粒体基因组数据将有助于进一步研究叶甲亚科的系统发育。

丝殊角萤叶甲 *Agetocera filicornis* (Laboissiere, 1927), 作为叶甲科萤叶甲亚科的 *Agetocera* 属的一个物种, 一直未有关于其线粒体基因组研究的报道。本研究首次成功获取了丝殊角萤叶甲的线粒体基因组序列, 并深入分析了其基因组结构等。此外, 还基于两种不同的数据矩阵分别利用两种不同的分析方法构建了叶甲亚科的系统发育树, 旨在明确 *Agetocera* 属在系统发育中的地位, 为深化叶甲亚科系统发育关系的理解提供了更多有力的证据。

1 材料与方法

1.1 标本采集与 DNA 提取

丝殊角萤叶甲成虫标本于 2022 年 7 月, 在重庆市阴条岭 (56°38'N, 109°47'E) 被成功采集。随后, 我们将这些成虫标本浸泡于 98% 乙醇中, 并置于 -80 °C 超低温冰箱中, 以确保样本的长期保存, 以备后续的 DNA 提取工作。DNA 的提取方法以及对提取的 DNA 进行浓度和质量的检测方法详见之前的研究 (林兴雨等, 2023)。

1.2 高通量测序与线粒体基因组组装

将提取的丝殊角萤叶甲成虫的 DNA 送往河南微智因科技股份有限公司利用 MG12000 测序平台进行高通量测序。使用 NGS QC v2.3.3 (Patel and Jain, 2012) 获得约 2 Gb 的干净数据。我们采用 GetOrganelle v1.7.5.2 软件 (Jin *et al.*, 2020), 利用其内置的 animal_mt 参数, 来精确定、有效过滤并高质量组装目标物种的线粒体基因组数据。这一步骤旨在从原始数据中筛选出与目标线粒体基因组高度相关的序列, 从而构建出准确可靠的线粒体基因组数据。线粒体基因组结构图结构由 Organellar GenomeDRAW (Greiner *et al.*, 2019) 绘制 (图 1)。

1.3 线粒体基因组的注释和分析

使用 MITOS (Bernt *et al.*, 2013) 去初步确定线粒体基因组的每个基因的边界。丝殊角萤叶甲线粒体基因组数据已经在 GenBank 中被释放, 序列号为 OR197604。参考文献 (Tamura *et al.*, 2021) 中的方法去分析丝殊角萤叶甲线粒体基因组的碱基组成情况和密码子的使用频率, 并利用 (Perna and Kocher, 1995) 以及 (Librado and Rozas, 2009) 中的方法对它的 AT 偏斜值和 GC 偏斜值以及核苷酸多样性 (Nucleotide diversity) 和进化速率 [non-synonymous (K_a) / synonymous (K_s)] 都进行比较分析。

1.4 系统发育分析

本研究使用叶甲亚科和萤叶甲亚科的 128 个物种作为内群, 肖叶甲亚科的 3 个物种作为外群去重建叶甲亚科的系统发育关系。利用 MAFFT 这一序列比对工具中的 E-INS-i 方法, 并设置了无脊椎动物密码子作为参数, 对 13 个蛋白质编码基因的核苷酸序列和氨基酸序列进行了精确比对, 这一步骤基于 Katoh 和 Standley 等人在 2013 年的研究方法 (Katoh and Standley *et al.*, 2013)。随后, 为了确保比对结果的质量, 我们进一步采用了 trimAl v1.4 软件中的 “automated1” 参数, 对质量不佳的片段进行了删

除和优化对齐,这一步骤借鉴了 Capella-Gutiérrez 等 (2009) 的工作,通过这一系列的精细处理,我们确保了比对结果的准确性和可靠性。使用脚本 FASconCAT-G_v1.04 (Kück and Longo, 2014) 串联得到两个不同的数据矩阵 (PCG_nt 和 PCG_aa)。

基于 PCG_nt 和 PCG_aa 两种数据矩阵,我们使用 IQ-TREE (Nguyen *et al.*, 2015) 这一系统发育分析工具进行系统发育分析,以构建准确的系统发育树。为确保系统发育树节点的可靠性,我们利用自举检验置信度 (Bootstraps) 来评估节点的支持率。在本次分析中,自举检验的运行次数被设置为 10 000 次,以确保结果的稳定性和准确性。采用 MrBayes v3.2 (Ronquist *et al.*, 2012) 对两种数据矩阵分别进行贝叶斯法分析的方法详见 (林兴雨等, 2024)。节点支持值使用后验概率 Posterior probability (PP) 进行评估。

2 结果与分析

2.1 线粒体基因组分析

丝殊角萤叶甲的线粒体基因组完整长度为 15 814 个碱基对,其组成包括 13 个蛋白质编码基因、24 个 RNA 基因以及一段非编码控制区。(表 1), T、C、A 和 G 的核苷酸含量占比分别为 36.3%、14.6%、40.3%和 8.8%。A+T 含量为 76.6%, G+C 含量为 23.4%、G+T 含量为 45.1%。因此,丝殊角萤叶甲的线粒体基因组具有丰富的 A+T 含量。非编码控制区全长为 1 215 bp,位于 *rrnS* 基因和 *trnI* 基因之间。丝殊角萤叶甲的 13 个蛋白质编码基因的相对密码子使用频率在表 2 中详细列出。在所有密码子中,UUA 的使用次数最为频繁,共出现了 406 次。相对而言,UCG 和 CGC 的使用次数则极为稀少,各自仅被使用了 2 次。这一数据反映了丝殊角萤叶甲对蛋白质编码基因中密码子的偏好性。此外,在它的线粒体基因组的碱基含量组成中,AT 偏斜为 0.053, GC 偏斜为 -0.252 (表 3)。

2.2 蛋白质编码基因分析

丝殊角萤叶甲线粒体基因组的 13 个蛋白质编码基因全长为 11 124 bp,其中, *atp6*、*atp8*、*cox1*、*cox2*、*cox3*、*cob*、*nad2*、*nad3* 和 *nad6* 共有 9 个蛋白质编码基因位于 H 链 (Heavy strand), *cox1* 基因最长为 1 548 bp, AT 含量为 66.2%, AT 偏斜和 GC 偏斜为 -0.094 和 -0.084。 *atp8* 基因最短为 156 bp, AT 含量为 82.7%, AT 偏斜和 GC 偏斜为 0.008 和 -0.704。剩余的 4 个蛋白质编码基因 *nad1*、*nad4*、*nad4l* 和 *nad5* 位于 L 链 (Light strand)。 *nad5* 基因最长为 1 696 bp, AT 含量为 78.2%, AT 偏斜和 GC 偏斜为 -0.229 和 0.303。 *nad4l* 基因最短为 282 bp, AT 含量为 79.4%, AT 偏斜和 GC 偏斜为 -0.232 和 0.414。在起始密码子的使用中,仅有蛋白质编码基因 *atp8* 使用 ATC 以及蛋白质编码基因 *nad1* 使用 TTG 作为起始密码子外,其余的 11 个蛋白质编码基因都是利用 ATT 和 ATG 作为起始密码子。蛋白质编码基因 *cox2*、蛋白质编码基因 *cox3*、蛋白质编码基因 *nad5* 和蛋白质编码基因 *nad4* 使用不完整的 T 作为终止密码子,剩余的 9 个蛋白质编码基因分别使用完整的终止密码子 TAA 和 TAG 两个密码子结尾。

由表 4 可知,叶甲亚科和萤叶甲亚科的核苷酸多样性和进化率存在显著差异。在 13 个蛋白质编码基因中,核苷酸多样性的变化范围较大,从蛋白质编码基因 *nad1* 的 0.174 到蛋白质编码基因 *nad2* 的 0.293 不等。特别值得注意的是,蛋白质编码基因 *nad2* 的核苷酸多样性达到了 0.293,是所有蛋白质编码基因中最多样化的一个。紧随其后的是蛋白质编码基因 *nad6* ($P_i=0.263$)、蛋白质编码基因 *atp8* ($P_i=0.246$)、蛋白质编码基因 *atp6* ($P_i=0.233$)、蛋白质编码基因 *nad4* ($P_i=0.222$) 和蛋白质编码基因 *nad4l* ($P_i=0.219$)。相对而言,蛋白质编码基因 *nad1* 的核苷酸多样性最低,仅为 0.174。

在进化率方面,叶甲亚科和萤叶甲亚科的 13 个蛋白质编码基因中,蛋白质编码基因 *nad4* (0.520)、蛋白质编码基因 *nad4l* (0.506) 和蛋

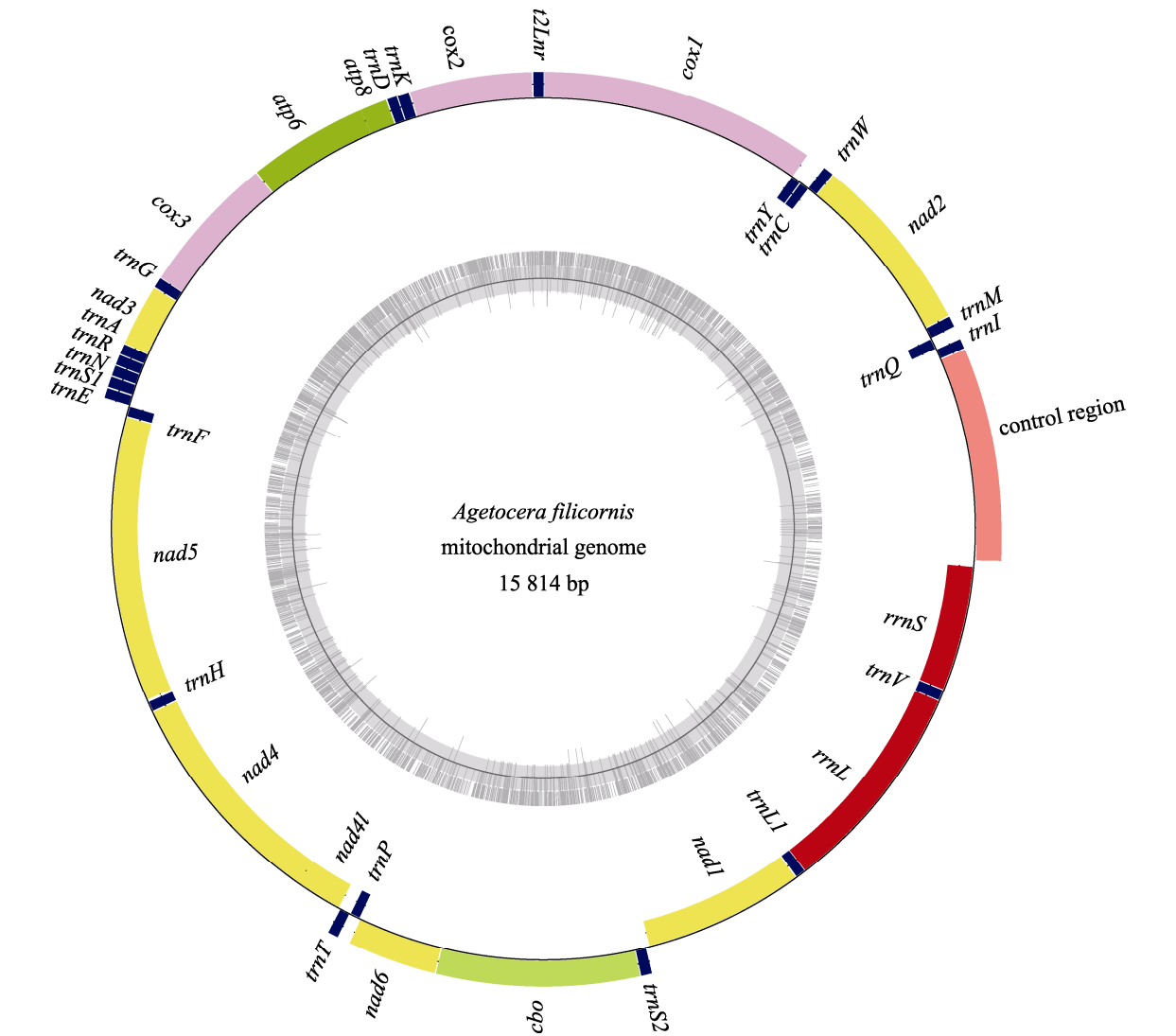


图 1 丝殊角萤叶甲线粒体基因组结构
Fig. 1 Structure of the *Agetocera filicornis* mitogenomes

表 1 丝殊角萤叶甲线粒体基因组注释
Table 1 Annotation of the *Agetocera filicornis* mitogenomes

基因 Gene	基因长度 (bp) Gene length (bp)	起始位置 (bp) Start position (bp)	终止位置 (bp) Stop position (bp)	起始密码子 Start codon	终止密码子 Stop codon	编码链 Coding strand
<i>trnI</i>	63	1 019	1 081			H
<i>trnQ</i>	69	1 151	1 083			L
<i>trnM</i>	69	1 151	1 219			H
<i>nad2</i>	1 014	1 220	2 233	ATT	TAA	H
<i>trnW</i>	65	2 232	2 296			H
<i>trnC</i>	61	2 349	2 289			L
<i>trnY</i>	64	2 413	2 350			L
<i>cox1</i>	1 548	2 406	3 953	ATT	TAA	H

续表 1 (Table 1 continued)

基因 Gene	基因长度 (bp) Gene length (bp)	起始位置 (bp) Start position (bp)	终止位置 (bp) Stop position (bp)	起始密码子 Start codon	终止密码子 Stop codon	编码链 Coding strand
<i>trnL2</i>	65	3 949	4 013			H
<i>cox2</i>	688	4 014	4 701	ATT	T	H
<i>trnK</i>	71	4 702	4 772			H
<i>trnD</i>	62	4 772	4 833			H
<i>atp8</i>	156	4 834	4 989	ATC	TAA	H
<i>atp6</i>	675	4 983	5 657	ATG	TAA	H
<i>cox3</i>	790	5 657	6 445	ATG	T	H
<i>trnG</i>	64	6 443	6 506			H
<i>nad3</i>	354	6 506	6 859	ATT	TAG	H
<i>trnA</i>	64	6 858	6 921			H
<i>trnR</i>	65	6 921	6 985			H
<i>trnN</i>	65	6 985	7 049			H
<i>trnS1</i>	66	7 050	7 115			H
<i>trnE</i>	63	7 117	7 179			H
<i>trnF</i>	66	7 244	7 179			L
<i>nad5</i>	1 696	8 940	7 245	ATT	T	L
<i>trnH</i>	65	9 014	8 950			L
<i>nad4</i>	1 330	10 344	9 015	ATG	T	L
<i>nad4l</i>	282	10 619	10 338	ATG	TAA	L
<i>trnT</i>	65	10 627	10 691			H
<i>trnP</i>	64	10 755	10 692			L
<i>nad6</i>	504	10 758	11 261	ATT	TAA	H
<i>cob</i>	1 140	11 261	12 400	ATG	TAG	H
<i>trnS2</i>	68	12 399	12 466			H
<i>nad1</i>	951	13 434	12 484	TTG	TAG	L
<i>trnL1</i>	65	13 500	13 436			L
<i>rrnL</i>	1 280	14 777	13 498			L
<i>trnV</i>	71	14 846	14 776			L
<i>rrnS</i>	747	15 592	14 846			L
Control region	1 215	15 618	1 018			Non-coding sequence

白质编码基因 *atp8* (0.464) 均展现出较高的进化率。这些基因在叶甲亚科和萤叶甲亚科的进化过程中可能扮演了更为重要的角色,但是蛋白质编码基因 *cox1* (0.165) 是进化率最低的蛋白质编码基因,其次是蛋白质编码基因 *cob* (0.194) 和蛋白质编码基因 *cox3* (0.200) 具有较低的进化率。

2.3 tRNA 和 rRNA 基因分析

丝殊角萤叶甲线粒体基因组的 22 个转运 RNA 基因的序列全长为 1 440 bp, 其中 H 链编码 14 个转运 RNA 基因, 全长 915 bp, AT 含量为 78.0%, GC 含量为 22.0%, AT 偏斜和 GC 偏斜为 0.046 和 - 0.05。L 链编码 8 个转运 RNA 基

表 2 丝殊角萤叶甲线粒体基因组 13 个蛋白编码基因的相对密码子使用频率 (RSCU)

Table 2 Relative synonymous codon usage (RSCU) of 13 protein-coding genes of the *Agetocera filicornis*

密码子 Codon	数量 Count	RSCU	密码子 Codon	数量 Count	RSCU	密码子 Codon	数量 Count	RSCU	密码子 Codon	数量 Count	RSCU
UUU(F)	303	1.76	UCU(S)	110	2.67	UAU(Y)	149	1.69	UGU(C)	23	1.59
UUC(F)	41	0.24	UCC(S)	24	0.58	UAC(Y)	27	0.31	UGC(C)	6	0.41
UUA(L)	406	4.05	UCA(S)	68	1.65	UAA(*)	6	1.33	UGA(W)	79	1.72
UUG(L)	46	0.46	UCG(S)	2	0.05	UAG(*)	3	0.67	UGG(W)	13	0.28
CUU(L)	47	0.47	CCU(P)	51	1.59	CAU(H)	59	1.64	CGU(R)	15	1.09
CUC(L)	11	0.11	CCC(P)	28	0.88	CAC(H)	13	0.36	CGC(R)	2	0.15
CUA(L)	80	0.80	CCA(P)	40	1.25	CAA(Q)	53	1.80	CGA(R)	35	2.55
CUG(L)	11	0.11	CCG(P)	9	0.28	CAG(Q)	6	0.20	CGG(R)	3	0.22
AUU(I)	364	1.76	ACU(T)	75	1.64	AAU(N)	178	1.77	AGU(S)	24	0.58
AUC(I)	49	0.24	ACC(T)	30	0.66	AAC(N)	23	0.23	AGC(S)	5	0.12
AUA(M)	229	1.81	ACA(T)	75	1.64	AAA(K)	98	1.77	AGA(S)	73	1.77
AUG(M)	24	0.19	ACG(T)	3	0.07	AAG(K)	13	0.23	AGG(S)	24	0.58
GUU(V)	79	2.03	GCU(A)	66	1.80	GAU(D)	51	1.55	GGU(G)	40	0.80
GUC(V)	15	0.38	GCC(A)	32	0.87	GAC(D)	15	0.45	GGC(G)	12	0.24
GUA(V)	58	1.49	GCA(A)	47	1.28	GAA(E)	70	1.67	GGA(G)	88	1.77
GUG(V)	4	0.10	GCG(A)	2	0.05	GAG(E)	14	0.33	GGG(G)	59	1.19

RSCU: 相对密码子使用频率, *终止密码子。RSCU: Relative synonymous codon usage, *: Stop codon.

表 3 丝殊角萤叶甲线粒体基因组的核苷酸组成

Table 3 Nucleotide composition of the *Agetocera filicornis* mitogenomes

基因 Genes	长度 (bp) Size (bp)	A+T (%)	AT 偏斜 AT-skew	GC 偏斜 GC-skew
PCGs-H	6 867	72.1	- 0.068	- 0.188
PCGs-L	4 257	78.0	- 0.240	0.310
<i>atp6</i> -H	675	73.2	- 0.073	- 0.271
<i>atp8</i> -H	156	82.7	0.008	- 0.704
<i>cox1</i> -H	1 548	66.2	- 0.094	- 0.084
<i>cox2</i> -H	688	71.8	- 0.036	- 0.206
<i>cox3</i> -H	789	69.7	- 0.076	- 0.146
<i>cob</i> -H	1 140	70.6	- 0.091	- 0.218
<i>nad1</i> -L	951	76.5	- 0.257	0.312
<i>nad2</i> -H	1 014	76.3	- 0.059	- 0.208
<i>nad3</i> -H	354	76.6	- 0.114	- 0.253
<i>nad4</i> -L	1 330	78.8	- 0.246	0.298
<i>nad4L</i> -L	282	79.4	- 0.232	0.414
<i>nad5</i> -L	1 696	78.2	- 0.229	0.303
<i>nad6</i> -H	504	82.2	0.005	- 0.311
<i>rrnL</i> -L	1 280	81.5	- 0.108	0.418
<i>rrnS</i> -L	747	81.4	- 0.046	0.353
rRNAs-L	2 027	81.4	- 0.085	0.394
tRNAs-H	915	78.0	0.046	- 0.050
tRNAs-L	525	80.4	- 0.043	0.456
全基因组 Whole genome	15 814	76.6	0.053	- 0.252

表 4 叶甲亚科和萤叶甲亚科 13 个蛋白质编码基因的核苷酸多样性和进化率分析

Table 4 The nucleotide diversity and evolutionary rate analyses of 13 protein-coding genes of the Chrysomelinae and Galerucinae mitogenomes

基因 Gene	核苷酸多样性 Nucleotide diversity	非同义 进化率 Ka	同义进 化率 Ks	非同义进化率 与同义进化率 的比值 Ka/Ks
<i>atp6</i>	0.233	0.159	0.493	0.323
<i>atp8</i>	0.246	0.201	0.433	0.464
<i>cox1</i>	0.186	0.083	0.503	0.165
<i>cox2</i>	0.183	0.103	0.475	0.217
<i>cox3</i>	0.192	0.103	0.515	0.200
<i>cob</i>	0.194	0.098	0.505	0.194
<i>nad1</i>	0.174	0.119	0.369	0.322
<i>nad2</i>	0.293	0.221	0.539	0.410
<i>nad3</i>	0.211	0.121	0.516	0.234
<i>nad4</i>	0.222	0.186	0.358	0.520
<i>nad4l</i>	0.219	0.180	0.356	0.506
<i>nad5</i>	0.182	0.124	0.373	0.332
<i>nad6</i>	0.263	0.202	0.464	0.435

因, 全长 525 bp, AT 含量为 80.4%, GC 含量为 19.6%, AT 偏斜和 GC 偏斜为 - 0.043 和 0.456。两个 RNA 基因 (*rrnS* 和 *rrnL*) 的总长度为 2 027 个碱基对, 其中 GC 含量占 18.6%, 而 AT 含量占 81.4%。AT 偏斜和 GC 偏斜为 - 0.085 和 0.394。此外, 22 个转运 RNA 基因中, *trnK* 和 *trnV* 基因最长分别为 71 bp。 *trnC* 基因最短为 61 bp。

2.4 线粒体基因组的碱基替代饱和度分析

本研究为验证所构建数据矩阵的碱基饱和情况, 采用了 DAMBE (Xia and Xie, 2001) 软

件对数据矩阵 (PCG_nt) 的不同的可操作分类单元数量进行碱基替代饱和度检验, 检测数据矩阵是否有足够的系统发育信息 (表 5)。

2.5 系统发育分析

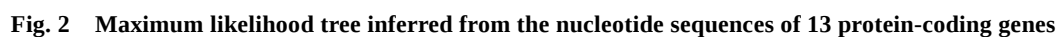
在本研究中, 我们采用了两种不同的数据集分别使用两种不同的方法的结果如图 2 至图 5 所示。尽管使用了不同的建树方法和数据矩阵, 但结果均显示萤叶甲亚科构成了一个单系群, 这意味着该亚科的所有成员都共享一个共同的祖先, 并且在演化树上形成了一个单一的分支。这一发现为理解该亚科内部物种的演化关系提供了重要视角。然而, 值得注意的是, 在这两种方法构建的系统发育树中, 叶甲亚科的两个物种 *Gastrolina thoracica* 和 *Gastrolina depressa* 被嵌入到萤叶甲亚科之中。这一结果表明, 这两个物种与萤叶甲亚科的其他成员更为密切地相关, 而与其所属的叶甲亚科的其他物种距离较远。因此, 这种嵌套关系导致了叶甲亚科在系统发育上表现为非单系群。此外, 无论是使用最大似然法或者贝叶斯法的分析中都认为丝殊角萤叶甲与 *Luperus* sp. EMHAU 15070805 构成姐妹群的关系, 并且这一关系得到了较高的节点支持值 (BP = 100; PP = 1)。这表明两者之间存在着紧密的亲缘关系, 且这一结论具有较高的统计信度。

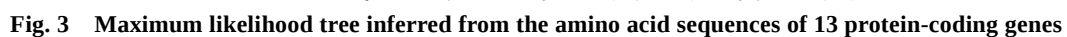
3 讨论

本研究通过测序、组装获得了萤叶甲亚科中 *Agetocera* 属第一条完整的线粒体基因组丝殊角萤叶甲的线粒体全基因组数据, 对其线粒体基因组结构进行了注释和分析, 明确了它的系统发育

表 5 利用 DAMBE 检测 PCG_nt 序列的碱基替代饱和性
Table 5 Sequence saturation test of PCG_nt performed by DAMBE

	可操作分类 单元数量 Number of OTU	替代饱和 指数 Iss	假设拓扑 结构对称 Iss.cSym	概率 Probability	假设拓扑 结构不对称 Iss.cAsym	概率 Probability
131taxa-PCG_nt	4	0.313	0.858	0.000	0.846	0.000
131taxa-PCG_nt	8	0.327	0.845	0.000	0.762	0.000
131taxa-PCG_nt	16	0.326	0.850	0.000	0.676	0.000
131taxa-PCG_nt	32	0.333	0.817	0.000	0.572	0.000









位置。此外, 叶甲亚科和萤叶甲亚科中 *nad2* 基因有最多样化的核苷酸多样性, 而 *nad1* 基因相反。*cox1* 基因是叶甲亚科和萤叶甲亚科中最保守的蛋白质编码基因, *nad4* 基因是进化速率最快的蛋白质编码基因。丝殊角萤叶甲的 37 个线粒体基因都没有出现特殊的排列方式或者缺失的情况 (Boore, 1999)。

叶甲亚科在传统的形态分类学上一直是一个非常稳定的群体, 其特点是幼虫和成虫都具有许多独特的衍生特征 (Chen, 1934)。之前的分子研究由于取样问题, 并没有意识到叶甲亚科为潜在的并系群关系。在最初的研究中, 仅从单一谱系中选取了两个叶甲亚科样本进行分析 (Farrell, 1998)。随后, 随着更多样本的加入 (Duckett *et al.*, 2004; Farrell and Sequeira, 2004), 通过结合形态学数据, 这一谱系才得以被重新确认为一个单系群。然而, Gómez-Zurita 等 (2008) 以及 Song 等 (2018) 的研究结果认为叶甲亚科为非单系群, 但是这项系统发育研究中仅有 3 个叶甲亚科的物种。随后, Nie 等 (2020) 基于更广泛的叶甲科物种线粒体基因组数据的研究中, 由于 *Timarcha* 单独形成一支, 而导致叶甲亚科的为非单系群。这个结果也得到了 Zhang 等 (2022) 的研究结果一致支持叶甲亚科为非单系群。此外, 在叶甲科的系统发育研究中, 研究者考虑到 *Timarcha* 遥远的位置和不明确的定位, 该研究增加了将 *Timarcha* 的地位定义为一个独立亚科而非叶甲亚科的论点 (Nie *et al.*, 2020), 这个分类结果正如 Jolivet 等 (2014) 所提议的一样。本研究结合 NCBI 的 GenBank 数据库已经释放的所有叶甲亚科和萤叶甲亚科的线粒体基因组数据 (128 个物种) 作内群和肖叶甲亚科分支类群的 3 个物种作外群, 选取目前较为全面的叶甲亚科和萤叶甲亚科的物种的线粒体基因组数据去重建叶甲亚科的系统发育关系。系统发育结果显示: 萤叶甲亚科为单系群。然而, 由于叶甲亚科的两个物种 *Gastrolina thoracica* 和 *Gastrolina depressa* 嵌入萤叶甲亚科中, 导致叶甲亚科形成非单系群。

本文构建的系统发育结果支持将叶甲亚科

视为非单系群, 这与大多数分子系统发育研究的结论一致 (Gómez-Zurita *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2018; Nie *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2022)。然而, 尽管先前的研究通常认为 *Timarcha* 的单独分支是导致叶甲亚科非单系性的主要原因, 但本研究的系统发育树中并未包括 *Timarcha* 的相关物种。相反, 我们的结果显示是由于 *Gastrolina thoracica* 和 *Gastrolina depressa* 嵌入萤叶甲亚科内部, 从而引发了叶甲亚科的非单系现象。

本研究的发现证实了线粒体基因组在进行系统发育分析中的重要作用。同时为了更加全面地理解这些昆虫群体的系统发育关系, 未来的研究应当包括更多的分类单元和遗传标记, 并结合转录组和基因组数据来进一步验证和细化这些结论。

参考文献 (References)

- Bermt M, Donath A, Jühling F, Externbrink F, Florentz C, Fritzsche G, Pütz J, Middendorf M, Stadler PF, 2013. MITOS: Improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69(2): 313–319.
- Boore JL, 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, 27(8): 1767–1780.
- Capella-Gutiérrez S, Silla-Martínez JM, Gabaldón T, 2009. trimAl: A tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, 25(15): 1972–1973.
- Chen S, 1934. Recherches sur les Chrysomelinae de la Chine et du Tonkin. Doctoral dissertation. Paris: Société Entomologique de France.
- Crowson RA, 1955. The Natural Classification of the Families of Coleoptera. London: Nathaniel Lloyd. 187.
- Duckett CN, Gillespie JJ, Kjer KM, 2004. Relationships among the subfamilies of Chrysomelidae inferred from small subunit ribosomal DNA and morphology, with special emphasis on the relationship among the flea beetles and the Galerucinae//Jolivet P, Santiago-Blay JA, Schmitt M(eds.). New Developments in the Biology of Chrysomelidae. Amsterdam: SPB Academic Publishing, The Hague. 3–18.
- Farrell BD, 1998. “Inordinate Fondness” explained: Why are there so many beetles? *Science*, 281(5376): 555–559.
- Farrell BD, Sequeira AS, 2004. Evolutionary rates in the adaptive radiation of beetles on plants. *Evolution*, 58(9): 1984–2001.
- Gillett CPDT, Crampton-Platt A, Timmermans MJTN, Jordal BH, Emerson BC, Vogler AP, 2014. Bulk de novo mitogenome

- assembly from pooled total DNA elucidates the phylogeny of weevils (Coleoptera: Curculionoidea). *Molecular Biology and Evolution*, 31(8): 2223–2237.
- Gómez-Zurita J, Hunt T, Vogler AP, 2008. Multilocus ribosomal RNA phylogeny of the leaf beetles (Chrysomelidae). *Cladistics*, 24(1): 34–50.
- Greiner S, Lehwark P, Bock R, 2019. Organellar Genome DRAW (OGDRAW) version 1.3. 1: Expanded toolkit for the graphical visualization of organellar genomes. *Nucleic Acids Research*, 47(W1): W59–W64.
- Jin JJ, Yu WB, Yang JB, Song Y, Depamphilis CW, Yi TS, Li DZ, 2020. GetOrganelle: A fast and versatile toolkit for accurate *de novo* assembly of organelle genomes. *Genome Biology*, 21(1): 241.
- Jolivet P, George P, Verma KK, 2014. Timarcha Latreille: A strange beetle and a living fossil. *Terrestrial Arthropod Reviews*, 7(1): 3–20.
- Katoh K, Standley DM, 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4): 772–780.
- Kück P, Longo GC, 2014. FASconCAT-G: Extensive functions for multiple sequence alignment preparations concerning phylogenetic studies. *Frontiers in Zoology*, 11(1): 81.
- Librado P, Rozas J, 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11): 1451–1452.
- Lin XY, Song N, 2023. Mitochondrial genome of *Lipaphis pseudobrassicae* (Davis, 1914) and phylogenetic analysis of Aphidinae. *Journal of Zhejiang University(Agriculture and Life Sciences)*, 50(01): 53–64. [林兴雨, 宋南, 2023. 菜缢管蚜的线粒体基因组及蚜亚科的系统发育分析. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 50(01): 53–64.]
- Lin XY, Song N, 2024. The mitochondrial genome and phylogenetic analysis of *Bruchus rufimanus* (Boheman, 1833). *Journal of Biosafety*, 33(1): 83–92. [林兴雨, 宋南, 2024. 蚕豆象的线粒体基因组研究及系统发育分析. 生物安全学报, 33(1): 83–92.]
- Lin XY, Zhai Q, Song N, Yin XM, 2023. The mitochondrial genome of *Oryzaephilus surinamensis* (Linnaeus, 1758) and a phylogenetic analysis of Cucujoidea. *Journal of Henan Agricultural University*, 57(1): 109–117. [林兴雨, 翟卿, 宋南, 尹新明, 2023. 锯谷盗线粒体基因组及扁甲总科系统发育分析. 河南农业大学学报, 57(1): 109–117.]
- Lin XY, Ren KJ, Song F, Song N, Li H, 2024. Sequencing of the Mitochondrial Genome of *Rhopalosiphum maidis* and Phylogenetic Analysis of Aphidini. *Genomics and Applied Biology*, 43(4): 675–684. [林兴雨, 任凯杰, 宋凡, 宋南, 李虎, 2024. 玉米蚜线粒体基因组测序及蚜族系统发育分析. 基因组学与应用生物学, 43(4): 675–684.]
- Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ, 2015. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1): 268–274.
- Nie RE, Andújar C, Gómez-Rodríguez C, Bai M, Xue HJ, Tang M, Yang CT, Tang P, Yang XK, Vogler AP, 2020. The phylogeny of leaf beetles (Chrysomelidae) inferred from mitochondrial genomes. *Systematic Entomology*, 45(1): 188–204.
- Patel RK, Jain M, 2012. NGS QC Toolkit: A toolkit for quality control of next generation sequencing data. *PLoS ONE* 7(2): e30619.
- Perna NT, Kocher TD, 1995. Patterns of nucleotide composition at fourfold degenerate sites of animal mitochondrial genomes. *Journal of Molecular Evolution*, 41(3): 353–358.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP, 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3): 539–542.
- Song N, Yin XM, Zhao XC, Chen JH, Yin J, 2018. Reconstruction of mitogenomes by NGS and phylogenetic implications for leaf beetles. *Mitochondrial Dna A*, 29(7): 1041–1050.
- Tamura K, Stecher G, Kumar S, 2021. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7): 3022–3027.
- Xia X, Xie Z, 2001. DAMBE: Software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity*, 92(4): 371–373.
- Zhang H, Song N, Yin XM, 2022. Higher-level phylogeny of Chrysomelidae based on expanded sampling of mitogenomes. *PLoS ONE*, 17(1): e0258587.