

断眼天牛 DNA 条码试剂盒的研制*

陈梦义^{1, 2**} 徐梅³ 钱路³ 安榆林³ 王焱⁴ 郝德君^{1, 2***}

(1. 南京林业大学, 南方现代林业协同创新中心, 南京 210037; 2. 南京林业大学林学院, 南京 210037;

3. 江苏出入境检验检疫局, 南京 210001; 4. 上海市林业总站, 上海 200072)

摘要 【目的】为了加强对检疫口岸截获木材中的断眼天牛种类进行准确、快速的鉴定, 克服单纯依赖于形态学方法为主的局限性, 我们研发了断眼天牛属 DNA 条码试剂盒检测技术。【方法】本研究基于线粒体 CO I 基因(线粒体细胞色素氧化酶亚基 I), 采用加拿大条码中心开发的昆虫及植物 DNA 提取方法, 对基因序列分析, 获得碱基位点规律。【结果】断眼天牛属中的 9 个常截获种类取得了标记性碱基位点。【结论】检疫中常截获的断眼天牛属中的 9 个种通过标记性碱基位点得到区分; 研发了断眼天牛属 DNA 条码试剂盒检测技术, 为进出口口岸的检疫工作提供一种新的鉴定手段。

关键词 断眼天牛属, DNA 条形码, CO I 基因, 分子鉴定

DNA barcoding identification kit technology for *Tetropium* species

CHEN Meng-Yi^{1, 2**} XU Mei³ QIAN Lu³ AN Yu-Lin³ WANG Yan⁴ HAO De-Jun^{1, 2***}

(1. Co-Innovation Center for the Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China;

2. College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 3. Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001 China; 4. Forest Station of Shanghai, Shanghai 200072, China)

Abstract [Objectives] To rapidly and accurately identify *Tetropium* spp., which are invasive pests commonly intercepted at quarantine ports in shipments of wood, and improve on current, mainly morphologically-based, methods of identifying these pests. [Methods] A DNA barcode detection kit was developed for *Tetropium* spp. based on the mitochondrial CO I gene. DNA extraction methods followed those of the Canadian Plant Development DNA barcode Center. [Results] Nine base sites were obtained from *Tetropium* spp. [Conclusion] Analysis of different genetic characteristics among *Tetropium* spp. allowed nine species to be identified. The newly developed DNA barcoding identification kit provides a new way of identifying this pest at ports of entry and exit.

Key words *Tetropium*, DNA barcode, CO I gene, molecular identification

断眼天牛属 *Tetropium* Kirby 属鞘翅目 Coleoptera 天牛科 Cerambycidae 椎天牛亚科 Spondilidinae, 目前已知存在 26 种(蒋书楠等, 1985)。虫体中小型, 该虫主要分布在北美和欧亚等地, 寄生包括云杉属 *Picea*、冷杉属 *Abies*、松属 *Pinus*、落叶松属 *Larix*、欧洲赤松 *Pinus densiflora*、鱼鳞松 *Picea jezoen* 等植物。断眼天

牛多生活在树势较弱的树木中, 取食树皮(韧皮部)和树干, 部分种如铁杉断眼天牛 *T. velutinum* 可侵袭并致死活树, 边材或皮层做蛹室化蛹(安榆林, 2012)。

进口木材检疫是我国进境植物检疫的重要组成部分, 经常能截获大量害虫。经济林木价值高, 天牛的危害经常造成严重的经济损失, 其中

* 资助项目 Supported projects: 国家科技支撑计划课题(2012BAK11B03); 上海市绿化管理局 2011 年科研项目(JB119927); 江苏省高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

**第一作者 First author, E-mail: chenmengyi520@qq.com

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

收稿日期 Received: 2015-06-23, 接受日期 Accepted: 2015-06-30

断眼天牛是较常见且重要的防治对象（蒋书楠，1989）。断眼天牛属主要分布于北美和欧洲。北美地区记载的种类包括：暗褐断眼天牛 *T. fuscum*、冷杉断眼天牛 *T. abietis*、金毛断眼天牛 *T. auripilis*、铁杉断眼天牛 *T. velutinum*、

红棕断眼天牛 *T. cinnamopterum*、小红棕断眼天牛 *T. parvulum*、施式断眼天牛 *T. schwarzianum*、平行断眼天牛 *T. parallelum*；欧洲地区记载的种类包括：云杉断眼天牛 *T. gracilicorne*、落叶松断眼天牛 *T. gabrieli*、光胸断眼天牛 *T. castaneum*、沟胸断眼天牛 *T. oreinum*、凹胸断眼天牛 *T. staudingeri*。传统的分类学是基于变种和变型基础上研究的，所谓的变种和变型，大都是从个体变异的观点来鉴定，因而不能代表自然类群，不能反映客观实际。新物种分类学是依据种群的基本概念，以种群为种下分类的基本单元，进而发展了种下分类，种类分化与物种形成的研究（Gerhard and Hans-Ulrich，1990）。近年来，线粒体 DNA CO I 基因序列迅速发展，并广泛应用于昆虫鉴定、描述隐存种及系统发育分析（代金霞和张大治，2010；杨倩倩等，2012）。目前基于线粒体 CO I 基因序列对断眼天牛属的研究鲜有报道。田雷雷（2013）基于线粒体 CO I 基因对农田金龟子设计特异性引物扩增建树，得到准确分类结果。池宇等（2011）利用 CO I 基因对寄蝇亚科 6 物种的 DNA 条形码分类，证明与形态学分类的结果一致。林晓佳等（2004）通过分析线粒体 DNA CO I 基因发现美国所发生的光肩星天牛不是从中国传入，并初步构建了光肩星天牛 PCR 鉴定试剂盒。

随着我国与世界各国贸易交往和文化交流的日益频繁，不可避免的将一些有害生物带来。为对口岸植物检疫截获的昆虫进行科学的风险评估，准确鉴定到种，我们研发了昆虫 DNA 条形码试剂盒检测技术（DNA barcoding identification kit technology），通过基因片段上的核苷酸多态位点规律及基因条码数据库比对最终进行物种鉴定。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

本研究所用断眼天牛标本来自 5 个国家（表 1），由江苏出入境检验检疫局动植食中心提供。常温下保存在 75%的无水乙醇，Parafilm 封口膜密封。

表 1 供试断眼天牛信息
Table 1 Date of the experimentation of *Tetropium Kirby*

实验编号 No.	种名 Species	来源地 Origin	截获日期 Intercept date
A5	落叶松断眼天牛	意大利 Italy	2012.08.21
A6	<i>T. gabrieli</i>	德国 Germany	2009.07.23
C4	暗褐断眼天牛	荷兰 Holland	2012.05.18
C5	<i>T. fuscum</i>	意大利 Italy	2012.03.30
H3		比利时 Belgium	2012.06.13
H4		荷兰 Holland	2010.06.11
H5	光胸断眼天牛	意大利 Italy	2013.04.08
H6	<i>T. castaneum</i>	德国 Germany	2008.04.10
H7		荷兰 Holland	2008.04.09
H8		俄罗斯 Russia	2008.03.03

1.2 DNA 提取及试剂

DNA 提取参照加拿大条码试剂中心（CCDB）开发的方法并稍作改进。步骤如下：取 2~30 mg 的动物组织，置于 1.5 mL 试管中（可震荡打碎样本）。在每个样品中加入 45.5 μ L Insect Lysis Buffer 和 4.5 μ L Proteinase K。56℃ 水浴温浴至组织完全裂解 6 h，难裂解的材料可以适当延长裂解时间甚至过夜裂解。裂解之后先 12 000 r/min 离心 15 s。加 100 μ L Binding Mix（BM），合上管盖，摇晃 10~15 s，10 000 r/min 离心 20 s。把管内液体转移到 Spin Column 中。12 000 r/min 离心 5 min。

接下来进行洗脱。加 180 μ L 的 Protein Wash Bufer（PWB）。12 000 r/min 离心 2 min。第二步，加 750 μ L 的 Wash Buffer（WB），12 000 r/min 离心 5 min。打开并合上管盖，再次 12 000 r/min 离心 5 min。打开管盖，56℃ 30 min 蒸发掉残余

的酒精。取下 Spin Column, 换上 DNA 收集管, 在膜的中央加入灭菌水 12 000 r/min 离心 5 min 收集 DNA。得到的 DNA 可立即使用或者置于 4℃短期保存或 -20℃长期储存。取 1~5 μL 的 DNA 模板进行目标片段 PCR 扩增。

1.3 序列选择与分析

在 NCBI 上下载断眼天牛属天牛的 CO I 序列 (表 2)。根据数据库中已知序列, 经软件 MEGA5.0 中的 ClustalW 剪切对齐, 保留序列长度 850 bp。选取序列经 Primer Premier 5.0 设计引物。

表 2 使用的 GenBank 中序列数据
Table 2 The sequence data in GenBank of this research

实验编号 No.	种名 Species	登录号 GenBank No.
A1	暗褐断眼天牛 <i>T. fuscum</i>	AY389478
A2		AY389477
A3		AY389476
A4		AY389475
B1	红棕断眼天牛 <i>T. cinnamopterum</i>	AY389474
B2		AY389473
B3		AY389472
B4		AY389471
C1	落叶松断眼天牛 <i>T. gabrieli</i>	AY389483
C2		AY389482
C3		EU883937
D1	铁杉断眼天牛 <i>T. velutinum</i>	AY389491
D2		AY389490
E1	凹胸断眼天牛 <i>T. staudingeri</i>	AY389489
E2		AY389488
F1	施氏断眼天牛 <i>T. schwarzi</i>	AY389487
F2		AY389486
G1	小红棕断眼天牛 <i>T. parvulum</i>	AY389485
G2		AY389484
H1	光胸断眼天牛 <i>T. castaneum</i>	AY389470
H2		AY389469
I1	云杉断眼天牛 <i>T. gracilicorne</i>	EU883938

1.4 PCR 反应体系

PCR 扩增采用巢式 PCR (Nested PCR), 第一轮引物: J1713/J1331 (郑斯竹等, 2012), 第二轮自行设计引物 T1/T2 (表 3)。

表 3 扩增断眼天牛属 CO I 基因所用引物
Table 3 Primers for amplifying *Tetropium* Kirby CO I gene

引物 名称 Primer name	引物序列 (5' - 3') Primer sequence	扩增长度 (bp) Amplification length
J1713	CCACAAATTTCTGAACATTGACC	800-1 500
J1331	GTGCAATGGATTAAACCCC	800-1 500
T1	TCTGAGCCTTAGGATTG	300-450
T2	GCAGGAGGAAGATGTTGA	300-450

CO I 扩增使用的反应体系为 25 μL, 包括模版 1 μL, ddH₂O 16.25 μL, 10 mmol/L dNTPs 2 μL, 10×Buffer 2.5 μL, 5 U/μL R-Taq 酶 0.25 μL, mg²⁺ 2 μL, 上下游引物各 1.0 μL。实验中发现, 可通过调整反应体系各组分含量, 进而增加条带亮度, 使实验结果成功率倍增。PCR 反应条件为: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 45 s, 35 个循环; 72℃延伸 5 min, 4℃保存。产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 并在凝胶成像系统下拍照 (图 1)。

2 结果与分析

2.1 遗传距离分析

基于 Mega5.0 对所有收集到的断眼天牛属序列整理, 计算进化分歧矩阵 (图 2), 选取 Kimura 2-parameter 双参数模型, 1 000 次重复引导。从图 2 可以看出, 样本间的遗传距离在 0.000~0.117 之间, 平均遗传距离 0.074; 种内遗传距离为 0.000~0.061; 种间遗传距离介于 0.037~0.105 之间。其中红棕断眼天牛和凹胸断眼天牛两个种间进化分歧最大 (0.105), 光胸断眼天牛和凹胸断眼天牛较小 (0.037), 二者在形态学上一致。

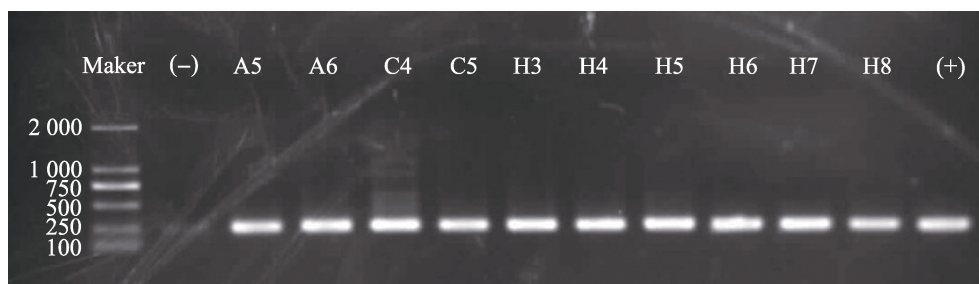


图 1 凝胶电泳检测

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis

A5, A6: 落叶松断眼天牛 *T. gabrieli*; C4, C5: 暗褐断眼天牛 *T. fuscum*; H3-H8: 光胸断眼天牛 *T. castaneum*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
1 H8		0.004	0.000	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.010	0.010	0.014	0.014	0.010	0.013	0.009	0.009	0.014	0.014	0.012	0.012	0.014	0.014	
2 H3	0.011		0.004	0.000	0.004	0.000	0.004	0.004	0.014	0.013	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.010	0.010	0.014	0.014	0.011	0.014	0.014	0.009	0.009	0.014	0.014	0.012	0.012	0.014	
3 H7	0.000	0.011		0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.010	0.010	0.014	0.014	0.010	0.013	0.009	0.009	0.014	0.014	0.012	0.012	0.014	0.014	
4 H5	0.011	0.000	0.011		0.004	0.004	0.004	0.004	0.014	0.013	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.010	0.010	0.014	0.014	0.011	0.014	0.014	0.009	0.009	0.014	0.014	0.012	0.012	0.014	
5 H4	0.006	0.009	0.006	0.009		0.004	0.000	0.000	0.014	0.013	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.009	0.009	0.013	0.013	0.010	0.013	0.013	0.009	0.009	0.014	0.014	0.012	0.012	0.014	
6 H6	0.011	0.000	0.011	0.000	0.009		0.004	0.004	0.014	0.013	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.010	0.010	0.014	0.014	0.011	0.014	0.014	0.009	0.009	0.014	0.014	0.012	0.012	0.014	
7 H1	0.006	0.009	0.006	0.009	0.000	0.009		0.000	0.014	0.013	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.009	0.009	0.013	0.013	0.010	0.013	0.013	0.009	0.009	0.014	0.014	0.012	0.012	0.014	
8 H2	0.006	0.009	0.006	0.009	0.000	0.009	0.000		0.014	0.013	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.009	0.009	0.013	0.013	0.010	0.013	0.013	0.009	0.009	0.014	0.014	0.012	0.012	0.014	
9 A6	0.004	0.001	0.004	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		0.002	0.004	0.004	0.004	0.004	0.014	0.015	0.015	0.014	0.014	0.014	0.014	0.015	0.014	0.014	0.014	0.014	0.015	0.015	0.013	0.013	0.014	
10 A5	0.001	0.008	0.001	0.008	0.009	0.009	0.009	0.009	0.002		0.003	0.003	0.003	0.003	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.015	0.013	0.013	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.012	0.012	0.014	
11 A1	0.006	0.004	0.006	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.000	0.000	0.000	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.015	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.013	0.013	0.014	
12 A2	0.006	0.004	0.006	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.015	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.013	0.013	0.014	
13 A3	0.006	0.004	0.006	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.015	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.013	0.013	0.014	
14 A4	0.006	0.004	0.006	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.015	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.013	0.013	0.014	
15 B1	0.009	0.006	0.009	0.006	0.001	0.006	0.001	0.001	0.001	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.000	0.000	0.002	0.002	0.015	0.015	0.013	0.013	0.015	0.011	0.011	0.015	0.015	0.012	0.012	0.014	0.014	
16 B2	0.009	0.006	0.009	0.006	0.001	0.006	0.001	0.001	0.001	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.000	0.000	0.002	0.002	0.015	0.015	0.013	0.013	0.015	0.011	0.011	0.015	0.015	0.012	0.012	0.014	0.014	
17 B3	0.101	0.099	0.101	0.099	0.094	0.099	0.094	0.094	0.094	0.091	0.091	0.091	0.091	0.091	0.002	0.002		0.000	0.015	0.015	0.013	0.013	0.015	0.012	0.012	0.015	0.015	0.012	0.012	0.014	0.014	
18 B4	0.101	0.099	0.101	0.099	0.094	0.099	0.094	0.094	0.094	0.091	0.091	0.091	0.091	0.091	0.002	0.002	0.000		0.015	0.015	0.013	0.013	0.015	0.012	0.012	0.015	0.015	0.012	0.012	0.014	0.014	
19 C4	0.042	0.044	0.042	0.044	0.040	0.044	0.040	0.040	0.098	0.096	0.101	0.101	0.101	0.101	0.104	0.104	0.104	0.000	0.014	0.014	0.014	0.003	0.014	0.014	0.011	0.011	0.016	0.016	0.012	0.012	0.014	
20 C5	0.042	0.044	0.042	0.044	0.040	0.044	0.040	0.040	0.098	0.096	0.101	0.101	0.101	0.101	0.104	0.104	0.104	0.000	0.014	0.014	0.014	0.003	0.014	0.014	0.011	0.011	0.016	0.016	0.012	0.012	0.014	
21 C1	0.089	0.092	0.089	0.092	0.087	0.092	0.087	0.087	0.087	0.084	0.089	0.089	0.089	0.089	0.077	0.077	0.080	0.080	0.099	0.099	0.000	0.015	0.012	0.012	0.015	0.015	0.013	0.013	0.013	0.006		
22 C2	0.089	0.092	0.089	0.092	0.087	0.092	0.087	0.087	0.087	0.084	0.089	0.089	0.089	0.089	0.077	0.077	0.080	0.080	0.099	0.099	0.000	0.015	0.012	0.012	0.015	0.015	0.013	0.013	0.013	0.006		
23 C3	0.047	0.049	0.047	0.049	0.044	0.049	0.044	0.044	0.103	0.101	0.103	0.103	0.103	0.103	0.106	0.106	0.106	0.106	0.094	0.094	0.104	0.104		0.014	0.014	0.012	0.012	0.016	0.016	0.012	0.012	0.015
24 D1	0.079	0.082	0.079	0.082	0.072	0.082	0.072	0.072	0.081	0.079	0.084	0.084	0.084	0.084	0.060	0.060	0.063	0.063	0.092	0.092	0.063	0.063	0.094	0.000	0.014	0.014	0.012	0.012	0.012	0.012	0.013	
25 D2	0.079	0.082	0.079	0.082	0.072	0.082	0.072	0.072	0.081	0.079	0.084	0.084	0.084	0.084	0.060	0.060	0.063	0.063	0.092	0.092	0.063	0.063	0.094	0.000	0.014	0.014	0.012	0.012	0.012	0.012	0.013	
26 E1	0.035	0.038	0.035	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.099	0.096	0.101	0.101	0.101	0.101	0.106	0.106	0.103	0.103	0.058	0.058	0.099	0.099	0.063	0.087	0.087		0.000	0.015	0.015	0.013	0.013	0.013
27 E2	0.035	0.038	0.035	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.099	0.096	0.101	0.101	0.101	0.101	0.106	0.106	0.103	0.103	0.058	0.058	0.099	0.099	0.063	0.087	0.087	0.000		0.015	0.015	0.013	0.013	0.013
28 F1	0.101	0.101	0.101	0.101	0.096	0.101	0.096	0.096	0.101	0.099	0.099	0.099	0.099	0.099	0.070	0.070	0.072	0.072	0.117	0.117	0.080	0.080	0.119	0.065	0.065	0.101	0.101		0.000	0.012	0.012	0.013
29 F2	0.101	0.101	0.101	0.101	0.096	0.101	0.096	0.096	0.101	0.099	0.099	0.099	0.099	0.099	0.070	0.070	0.072	0.072	0.117	0.117	0.080	0.080	0.119	0.065	0.065	0.101	0.101	0.000		0.012	0.012	0.013
30 G1	0.065	0.072	0.065	0.072	0.063	0.072	0.063	0.063	0.074	0.072	0.077	0.077	0.077	0.077	0.084	0.084	0.087	0.087	0.070	0.070	0.080	0.080	0.075	0.063	0.063	0.075	0.075	0.080	0.080	0.000	0.013	
31 G2	0.065	0.072	0.065	0.072	0.063	0.072	0.063	0.063	0.074	0.072	0.077	0.077	0.077	0.077	0.084	0.084	0.087	0.087	0.070	0.070	0.080	0.080	0.075	0.063	0.063	0.075	0.075	0.080	0.080	0.000	0.013	
32 I1	0.087	0.094	0.087	0.094	0.089	0.094	0.089	0.089	0.087	0.084	0.089	0.089	0.089	0.089	0.077	0.077	0.080	0.080	0.097	0.097	0.015	0.015	0.102	0.066	0.066	0.087	0.087	0.080	0.080	0.077	0.077	

图 2 断眼天牛属 CO I 基因 Kimura 2-parameter 遗传距离和标准误

Fig. 2 Pairwise distances based on the *Tetropium* Kirby of Kimura 2-parameter for genetic mitochondrial CO I genes and standard error

上三角为标准误, 下三角为遗传距离 The upper triangle is the standard error and the genetic distance of the lower triangle.

1-8.光胸断眼天牛 *T. castaneum*, H1-H8; 9-14.暗褐断眼天牛 *T. fuscum*, A1-A6; 15-18.红棕断眼天牛 *T. cinnamopterum*, B1-B4; 19-23.落叶松断眼天牛 *T. gabrieli*, C1-C5; 24-25.铁杉断眼天牛 *T. velutinum*. D1-D2; 26-27.凹胸断眼天牛 *T. staudingeri*, E1-E2; 28-29.施氏断眼天牛 *T. schwarzianum*, F1-F2; 30-31.小红棕断眼天牛 *T. parvulum*, G1-G2; 32.云杉断眼天牛 *T. gracilicorne*, I1.

2.2 系统发育树构建

断眼天牛属同一种选取 2~5 条序列, 剪切对齐, 保留长度 470 bp。采用 Mega5.0 中的邻接法 (Neighbour-Joining) 和极大似然法 (Maximum Likelihood) 构建系统进化树, 如图 3, 图 4 所示。两种建树方法所得到的拓扑结构相近, 无明显差异。不同种间形成不同支系, 相同种以较高的置信度聚为一个分支, 其中红棕断眼天牛、施氏断眼天牛、铁杉断眼天牛、暗褐断眼天牛、平行断

眼天牛 *T. parvulum*、凹胸断眼天牛在两种树中均以 100% 的置信度聚为一支, 落叶松断眼天牛 (C1、C2 与 C2、C3、C4、C5) 5 个种分为两支, 并不理想。

2.3 标记性碱基位点检测

序列整合后一并上传至植物有害信息网站 (<http://58.211.92.14/sysinspect/index.aspx>)。得到断眼天牛属 9 个种 32 个个体条码序列, 并经地理种自动合并序列, 序列有害生物鉴定特征及

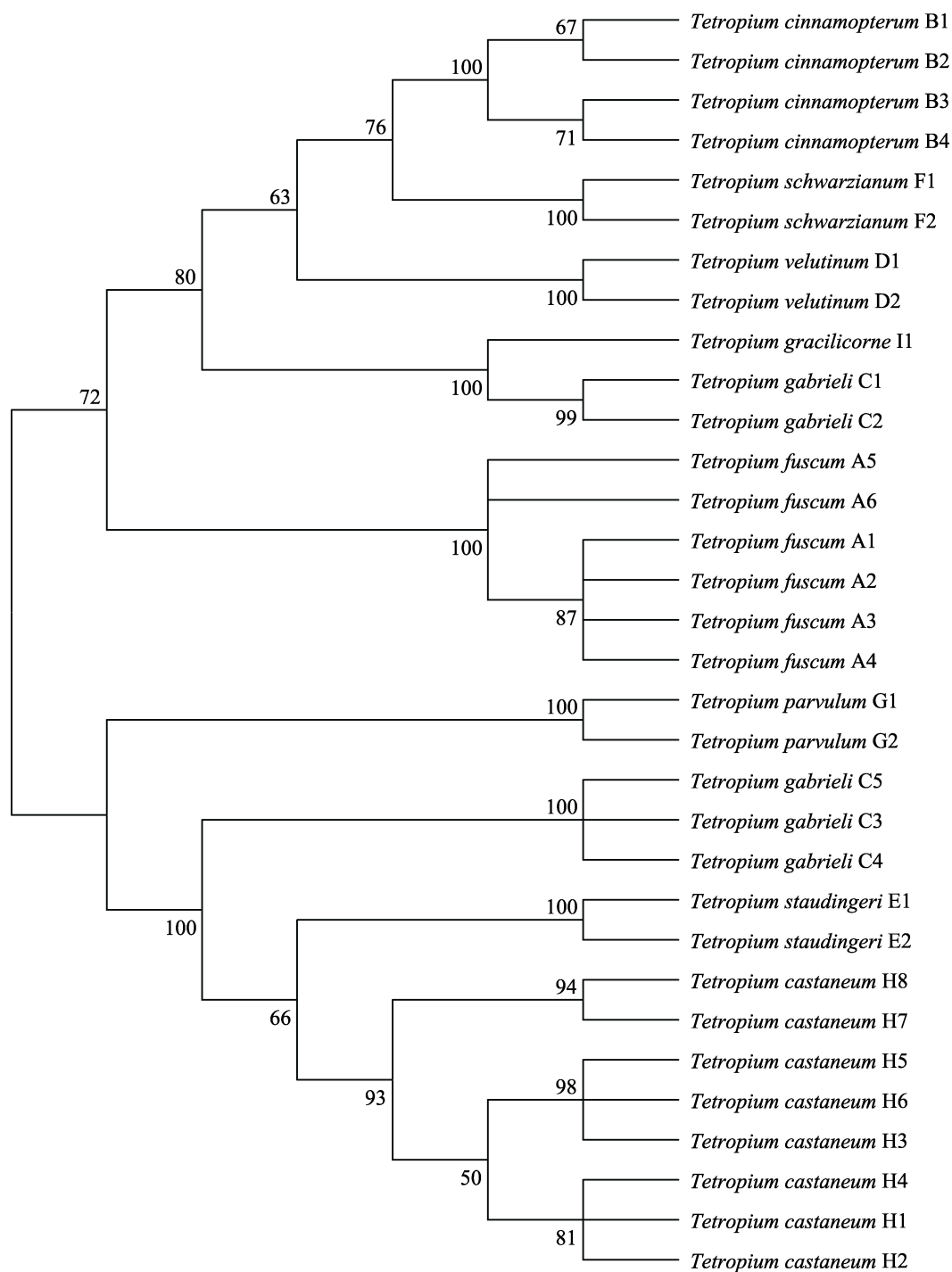


图3 基于 CO I 基因部分序列对断眼天牛属构建的 NJ 树

Fig. 3 NJ tree of *Tetropium* Kirby based on the mtDNA CO I gene sequence

有害生物标记性碱基 (图 5)。图 4 中段眼天牛 8 个种获得标记性碱基, 如表 4 所示。落叶松断眼天牛未能得到标记性碱基位点, 其近缘种是云杉断眼天牛, 二者序列位点相比较, 在 P225(T\G)、P465(A\G)不同, 可区分开来。

3 讨论

分子生物技术的发展为形态分类学带来了一种新的手段 (Garaizar *et al.*, 2006)。本研究基于 CO I 基因对断眼天牛属设计条码试剂盒,

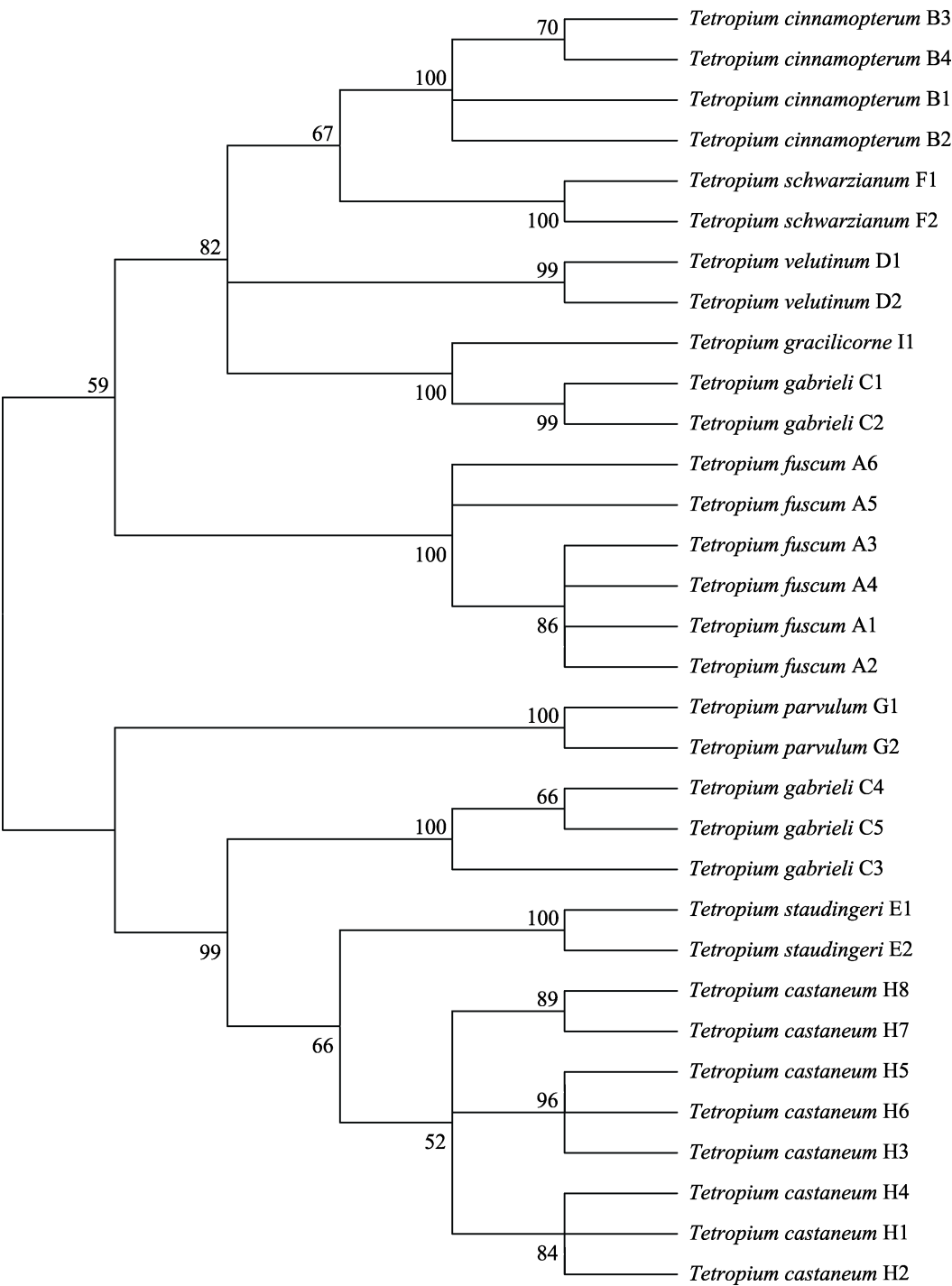


图 4 基于 CO I 基因部分序列对断眼天牛属构建的 ML 树

Fig. 4 ML tree of *Tetropium* Kirby based on the mtDNA CO I gene sequence

初步实现了利用分子生物学手段对断眼天牛属有效、准确和快速的鉴定 (Elias *et al.*, 2007; Burns *et al.*, 2008; 刘勇等, 2010)。研究中针对断眼天牛属 CO I 基因设计一对引物扩增长度约 470 bp 的序列, 计算种内与种间遗传距离。

分别用 NJ 法和 ML 法构建系统分子发育树, 结果表明两种建树方法的拓扑结构大致相同, 并与形态学相符 (陈乃中, 2008), 但落叶松断眼天牛在两种建树方法中均未得到有效区分, 此状况的原因可能是目的基因的选取或 Genbank 已有

表 4 断眼天牛属标记性碱基位点信息
Table 4 The specific site of *Tetropium* Kirby species

种名 Species	标记性碱基位点 Special base site	位点数目 Number of base site
暗褐断眼天牛 <i>T. fuscum</i>	P12, P117, P132	8
红棕断眼天牛 <i>T. cinnamopterum</i>	P39, P99, P129	11
落叶松断眼天牛 <i>T. gabrieli</i>	*	0
铁杉断眼天牛 <i>T. velutinum</i>	P48, P162, P460	3
凹胸断眼天牛 <i>T. staudingeri</i>	P105, P134, P144	4
施氏断眼天牛 <i>T. schwarzanum</i>	P1, P75, P172	11
小红棕断眼天牛 <i>T. parvulum</i>	P30, P216, P370	4
光胸断眼天牛 <i>T. castaneum</i>	P48, P54	2
云杉断眼天牛 <i>T. gracilicorne</i>	P225	1



图 5 断眼天牛属 COI 基因位点信息

Fig. 5 The genetic information of *Tetropium* Kirby COI genes

的基因可能存在误差。碱基位点分析结果表明本研究中所有断眼天牛均可得到有效区分,其中红棕断眼天牛和施氏断眼天牛获得标记性碱基最多(11个),云杉断眼天牛有1个标记性碱基,而落叶松断眼天牛在此长度470 bp的COI基因序列中并未获得标记性碱基,但可通过近似种位点比对也可区分。近年来众多学者成功利用COI基因进行系统发育分析(付景,2007;杨宝

山等,2009;Rickyw *et al.*, 2010;陈占秀和顾耘,2012),说明NJ和ML建树方法可信,为后续本研究中标记性碱基位点支持断眼天牛属的分类提供支撑。本研究根据基因位点规律,对断眼天牛属中9个重要的检疫性害虫进行区分、鉴定,其中8个种得到标记性碱基,得到理想效果,为日后检疫口岸物种鉴定,阻止有害生物进一步扩散与蔓延提供了一种新的手段。本研究个别种

(暗褐断眼天牛) 并未获得标记性碱基, 可通过改善引物, 进而增加扩增序列长度, 获得标记性碱基; 此外本研究中只针对目前我国检疫口岸常截获的断眼天牛属部分种类进行系统发育分析、鉴定分类, 可在后续实验中补充标本, 完善研究。

参考文献 (References)

- Burns JM, Burns JM, Janzen DH, Hajibabaei M, Hallwachs W, Hebert PD, 2008. DNA barcodes and cryptic species of skipper butterflies in the genus *Perichares* in Area de Conservacion Guanacaste, Costa Rica. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105(17): 6350–6355.
- Elias M, Hill RI, Willmott KR, Dasmahapatra KK, Brower AV, Mallet J, Jiggins CD, 2007. Limited performance of DNA barcoding in a diverse community of tropical butterflies. *Proc. R. Soc. B*, 1627 (274): 2881–2889.
- Garaizar J, Rementeria A, Porwollik S, 2006. DNA microarray technology: a new tool for the epidemiological typing of bacterial pathogens? *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 47(2): 178–189.
- Gerhard E, Hans-Ulrich S, 1990. Classification of insects by echolocating greater horseshoe bats. *Journal of Comparative Physiology A*, 167(3): 423–430.
- Rickyw KT, Cynthia Y, Wai CN, 2010. Identification of stomatopod larvae (Crustacea: Stomatopoda) from Hong Kong waters using DNA barcodes. *Molecular Ecology Resources*, 10(3): 439–448.
- Chi Y, Zhi Y, Wang SD, 2011. Some species of Tachinidae mitochondrial CO I gene DNA barcode classification. *Journal of Shenyang Normal University (Natural Science Edition)*, 29 (3): 434–438. [池宇, 智妍, 王诗迪, 2011. 寄蝇亚科部分物种线粒体 CO I 基因 DNA 条形码分类. 沈阳师范大学学报(自然科学版), 29(3): 434–438.]
- Chen NZ, 2008. Plant Quarantine Pest China. Beijing: China Agriculture Press. 122–123. [陈乃中, 2008. 中国进境植物检疫有害生物. 北京: 中国农业出版社. 122–123.]
- Chen ZX, Gu Y, 2012. Study on Application CO I Gene in the Homoptera Aphitidae. *Journal of Qingdao Agricultural University (Natural Science)*, 29(4): 261–266. [陈占秀, 顾耘, 2012. 线粒体 CO I 基因在同翅目蚜科昆虫种类鉴定中的应用研究. 青岛农业大学学报(自然科学版), 29(4): 261–266.]
- Dai JX, Zhang DZ, 2010. Discussion on the phylogeny of partial Chrysomelidae insects based on CO I gene sequences. *Journal of Ningxia University (Natural Science Edition)*, 39 (1): 78–82. [代金霞, 张大治, 2010. 从 COI 基因序列探讨叶甲科部分昆虫的系统关系. 宁夏大学学报(自然科学版), 39 (1): 78–82.]
- Fu J, 2007. Phylogenetic Analysis and dietary evolution of some species of Coccinellidae (Coleoptera: Polyphaga: Cucujoidea) based on partial sequence of mitochondrial CO I Gene. Master degree thesis. Xi'an: Shaanxi Normal University. [付景, 2007. 瓢虫科部分种类基于线粒体 CO I 基因的系统发育与食性演化研究. 硕士学位论文. 西安: 陕西师范大学.]
- Lin XJ, 2004. Genetic difference of mtDNA CO I gene of *A. glabripennis* and its sibling species and PCR identification kit of *A. glabripennis*. Master degree thesis. Nanjing: Nanjing Forestry University. [林晓佳, 2004. 光肩星天牛及其近缘种线粒体 DNA CO I 基因遗传差异及其 PCR 鉴定试剂盒的研究. 硕士学位论文. 南京: 南京林业大学.]
- Liu Y, Song Y, Li XY, 2010. DNA barcoding based on the mitochondrial CO I gene sequences for insect. *Plant Quarantine*, 24 (2): 46–50. [刘勇, 宋毓, 李晓宇, 2010. 基于线粒体 COI 基因的 DNA 条形码技术在昆虫分子鉴定中的应用. 植物检疫, 24 (2): 46–50.]
- Tian LL, 2013. Study on application CO I gene in the farmland beetle. Master degree thesis. Changchun: Jilin University. [田雷, 2013. 基于线粒体 COI 基因的农田金龟子 DNA 条形码研究. 硕士学位论文. 长春: 吉林大学.]
- Jiang SN, 1989. The Larvae of China. Chongqing: Chongqing Press. 136–138. [蒋书楠, 1989. 中国天牛幼虫. 重庆: 重庆出版社. 136–138.]
- Jiang SN, Pu FJ, Hua LZ, 1985. China Economic Insects, Nineteenth volumes. Beijing: Science Press. 87–89. [蒋书楠, 蒲富基, 华立中, 1985. 中国经济昆虫志, 第 19 册. 北京: 科学出版社. 87–89.]
- Yang QQ, Li ZH, Wu W, 2012. Advance and application of mtDNA CO I barcodes on insects. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(6): 1687–1695. [杨倩倩, 李志红, 伍祎, 2012. 线粒体 COI 基因在昆虫 DNA 条形码中的研究与应用. 应用昆虫学报, 49(6): 1687–1695.]
- Zheng SZ, 2012. The construction of the bar code and the research of molecular rapid identification technology. Doctoral Dissertation. Nanjing: Nanjing Forestry University. [郑斯竹, 2012. 天牛科基因条形码构建及分子快速鉴定技术研究. 博士学位论文. 南京: 南京林业大学.]