

玉米象 *Sitophilus zeamais* DNA 条形码研究*

陈光辉^{1,2**} 李焱² 刘东² 李凤姐³
阿依努尔·阿卜杜艾尼² 胡红英^{1***}

(1. 新疆大学生命科学与技术学院, 乌鲁木齐 830046; 2. 新疆维吾尔自治区喀什出入境检验检疫局技术中心, 喀什 844000; 3. 新疆石河子 143 团第一中学, 石河子 832000)

摘要 【目的】玉米象 *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) 为世界性分布仓储物害虫, 食性极广, 在我国多数省(区)均有分布。由于该虫与米象 *Sitophilus oryzae* (Linnaeus) 形态极似, 很难区别; 目前唯一可靠的鉴别特征是雌、雄外生殖器, 且要实现准确鉴定必须要有成虫标本, 还要经过一系列的繁琐操作, 鉴定难度较大, 因此需要探索更加便捷高效的鉴定技术。【方法】利用分子生物学手段, 通过提取玉米象的基因组 DNA, 使用通用引物 PCR 扩增 *ITS1*、*ITS2*、*Cytb*、*CO*、*CO* 基因并测序, 通过基因序列相似性来实现快速鉴定, 进而获得用于快速鉴定的 DNA 条形码。【结果】通过形态特征, 初步确定玉米象所属大致类群; 通过分子生物学手段, 获得了多个基因的碱基序列作为玉米象的 DNA 条形码。【结论】获得多条序列用来鉴定玉米象的 DNA 条形码, 实现玉米象快速准确鉴定, 为玉米象的识别鉴定提供基础数据。

关键词 玉米象, DNA 条形码, 快速鉴定, *ITS1*, *ITS2*, *Cytb*, *CO*, *CO* 基因

DNA barcoding of *Sitophilus zeamais* (Motschulsky)

CHEN Guang-Hui^{1,2**} LI Yan² LIU Dong² LI Feng-Jie³ AYNUR · Abdigini² HU Hong-Ying^{1***}

(1. College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China; 2. Inspection and Quarantine Technique Service Center, CIQ Kashgar Branch, Kashgar 844000, China; 3. The First Middle School of the 143 Regiment, Shihezi 832000, China)

Abstract 【Objectives】*Sitophilus zeamais* (Motschulsky) is a global pest of a broad variety of stored foodstuffs that is found in most provinces (regions) of China. Many morphological features of *S. zeamais* are similar to those of *S. oryzae*, which makes these species difficult to distinguish reliably. Since the only diagnostic features are the male and female genitalia, it is only possible to reliably identify adults. It would be useful, therefore, to develop alternative methods that can efficiently and reliably identify other life-stages. 【Methods】Genomic DNA of *S. zeamais* was extracted and the *ITS1*、*ITS2*、*Cytb*、*CO*、*CO* genes amplified and sequenced via PCR using universal primers. Rapid identification on the basis of gene sequence similarity was done and a DNA barcode for the rapid identification of *S. zeamais* obtained. 【Results】*S. zeamais* specimens were identified based on morphological characteristics, and the base sequence of corresponding genes obtained and used as the DNA barcode for this species. 【Conclusion】A number of gene sequences were obtained that can be used for DNA barcoding of *S. zeamais*, thereby allowing the rapid and accurate identification of this pest.

Key words *Sitophilus zeamais*, DNA barcoding, rapid identification, *ITS1*, *ITS2*, *Cytb*, *COI*, *CO* gene

玉米象 *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) 隶 是非常重要的世界性储粮害虫, 也是中国储粮的
属于鞘翅目(Coleoptera)象甲科(Curculionidae), 头号害虫(刘永平等, 1983; 钱祖香, 1989)。

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金项目 (U1170305)

**第一作者 First author, E-mail: 554937802@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: hooHYI-69@163.com

收稿日期 Received: 2017-11-01, 接受日期 Accepted: 2018-03-14

该虫属钻蛀性害虫, 食性很广, 不仅危害玉米、小麦、高粱等粮食作物, 还寄生于豆、麦、花生、干果、面包、酵母饼等仓储物(梁英华和王登齐, 2013); 适宜条件下, 在粮食储藏期所造成的重量损失 3 个月内可高达 11.25%, 6 个月内可高达 35.12%。该虫是一种多世代害虫, 成虫啃食, 幼虫蛀食谷粒。成虫钻入谷物中掏空谷粒内部, 造成储粮堆温度和湿度升高, 粮堆发热、结块、霉变, 为后续害虫的产生创造了条件(白旭光等, 2002; 尹文雅和王小平, 2002)。该虫主要为害贮存 2 至 3 年的陈粮, 是一种最主要的初期性害虫, 咬食贮粮而造成许多碎粒及粉屑、能使粮食水分增高和发热。幼虫只在禾谷类种子内为害。该虫对玉米、小麦、高粱等储粮危害极大, 每年损害粮食无数(唐建阳和黄书针, 1989; 白旭光等, 2002; 尹文雅和王小平, 2002)。

在我国玉米象每年能够繁殖 1 代至 7 代, 因气候条件不同而有所差异。该虫耐寒力、活动能力和耐饥能力均比米象强, 发育速度快(李隆术, 2009)。最适的发育温度约为 29.1℃, 最高的发育温度约为 32.3℃(王殿轩等, 2016)。在东北地区每年发生两代, 在华北地区每年发生 5-6 代, 在中国越往南每年繁殖的代数越多(黄建国, 1982; 张晶东等, 1995)。

玉米象较难防治, 诱杀及预防方法如下:

1) 清洁仓库以消除米象的藏身之地, 对于清扫不到的孔洞和缝隙应填满堵塞(刘晓宇, 2009)。2) 机械防治, 用风筛法将害虫和灰尘从粮食中筛选出来, 用聚乙烯、纤维质地的材料将粮食进行包装等。3) 物理防治, 通过辐射、高温暴晒、烘干、蒸汽、开水、低温、缺氧、真空充 N_2 、充 CO_2 等方法灭虫(沈兆鹏, 1997)。4) 化学防治, 如使用敌百虫、敌敌畏、磷化氢、溴甲烷以及马拉硫磷等化学试剂熏蒸或喷施杀虫(王银成和崔健, 1983; 沈兆鹏, 1996)。5) 特殊植物气味熏避玉米象, 如大葱、大蒜、姜、八角、茴香等具有特殊气味的植物驱虫。针对仓库储粮玉米象的防治, 目前主要采用的是磷化氢和溴甲烷以及马拉硫磷等化学试剂进行熏蒸, 但在玉米象被消灭的同时会使得粮食产生农药残留或使玉米象产生抗药性(冯存岭, 2002), 在提高剂量和

抗性增强之间形成了恶性循环(付昌斌和张兴, 1996), 因此玉米象较难防治。

对害虫进行准确识别是害虫防治和出入境植物检疫工作的基础。目前, 玉米象鉴定以传统形态学方法为主。形态学方法具有研究方便, 直观等特点(梁帆等, 2007), 但对标本质量、数量要求较高, 并要求鉴定者熟练掌握相应生物领域的基础知识。玉米象成虫体长仅 2.9-4.2 mm, 形体小(周力兵等, 1988), 与米象、谷象的形态特征极为相似(曹志丹, 1980; 罗禄怡等, 1982; 杨志远等, 1989); 而且要实现玉米象的准确鉴定必须要获得成虫标本, 将成虫解剖后取出外生殖器, 进行清洁整理后再在解剖镜下观察鉴定; 因此, 在没有成虫的情况下就无法实现准确鉴定(周力兵等, 1988)。目前看来, 形态学鉴定在玉米象鉴定的实际应用中依然存在诸多局限, 因此, 需要探索更加简便、准确、快捷的鉴定方法。

以分子生物学手段为基础的 DNA 条形码技术能够在很大程度上弥补了形态学鉴定的不足, DNA 条形码以 DNA 序列为对象, 具有准确度高、简便快速等优点, 已被广泛应用于各物种的分类学鉴定(肖金花等, 2004; 韦健红等, 2010)。自 2003 年, Brown 等最早引入 DNA 条形码作为主参数进行描述新发现的鳞翅目卷蛾科(Lepidoptera: Tortricidae)的 *Xenothictis meyrick*(李青青等, 2010), Tautz 等(2002)首先提出了 DNA 分类的概念, 随后 Hebert 等(2003a, 2003b)首次正式提出 DNA 条形码(DNA barcoding)的概念, DNA 条形码是应用有足够变异的标准化短基因片段对物种进行快速、准确鉴定的新的生物身份识别系统, 具有快速、准确、高效、且不受发育阶段的影响等优点(张媛等, 2011; 周青松等, 2013)。Hebert 等(2003b)对动物界 11 门 13 320 种的 CO 基因序列进行比较研究发现, 超过 98% 的物种间的遗传距离大于 2%, 而种内遗传距离多小于 1%, 很少超过 2%, 能够广泛用于动物分类。现有的研究数据表明绝大多数物种的 CO 序列表现出相对较低的种内遗传差异及相对较高的种间遗传差异(Folmer et al., 1994; Hebert et al., 2003b; Ward et al., 2005; Hajibabaei et al., 2006; 张媛等,

2011)。研究表明 *ITS1*、*ITS2*、*COI* 等基因均适合物种及其种群的研究(黄华平等, 2006); 其中 *ITS1*、*ITS2* 基因由于选择压力小, 变异较大, 种内遗传差异相其他基因对较高, 可以用于种群之间的研究。*ITS1* 基因序列种内遗传距离有时会超过 3%, 也可以有效区别物种(Robert, 2013); 如 NCBL 数据库中的 *ITS1* 基因, 相似度为 96%-97%, 相对某些基因相似度较低, 种内遗传距离超过 3%, 但也能进行有效的鉴定。随着 DNA 条形码技术的推进, 有统计显示, 已经发布的 DNA 条形码序列有近 20 万种。DNA 条形码技术是近年来发展快速的一种生物鉴定分类方法, 与传统分类学中的鉴定方法相比较, DNA 条形码具有更加客观、简便、准确、快捷等优点(宋南等, 2013), 在系统学等方面的研究已经日渐成熟稳定, 利用分子生物学手段筛选出快速鉴定 DNA 条形码将是发展方向之一。

本研究通过提取寄生在大米中玉米象基因组 DNA, 运用 DNA 条形码技术, 获得玉米象 *ITS1*、*ITS2*、*Cytb*、*CO*、*CO* 基因序列, 克服传统形态分类学鉴定方法存在的不足, 实现玉米象的快速鉴定(赵广宇等, 2014)。形态学分类确定玉米象的大致类群是检索或设计正确引物的基础, 检索或设计出能够扩增出玉米象 *ITS1*、*ITS2*、*Cytb*、*CO*、*CO* 基因的引物是关键, 将获得的分子数据进行统计分析作为形态学特征的补充。

本研究的创新之处在于结合形态学特征, 利用 DNA barcoding 技术测出玉米象 *ITS1*、*ITS2*、*Cytb*、*CO*、*CO* 基因的 DNA 序列, 丰富了玉米象数据库, 为该虫快速鉴定及识别监测提供了理论基础。实现了玉米象的快速、准确鉴定(朱振华等, 2005), 为初期该虫的监测和采取防治措施, 为阻断其在新疆的传播和扩散(武宇鹏等, 2011; 伏建国等, 2012) 提供了基础数据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器设备

体视显微镜 (Motic Cam2506 SMZ168)、全自动体视显微镜 (蔡司 Discovery 2.0)、高倍制

冷显微镜 (Motic Cam5000L)、PCR 仪 (Biometra TProfessional standard Gradient Thermocycler)、高速低温离心机 (BECKMAN COULTER™ Allegra™ X-22R Centrifuge)、制冰机 (SANYO Ice Maker SIM-F140AY65)、电泳仪 (JY1600C)、水平电泳槽 (美国 Bio-Rad)、凝胶成像仪 (Bio-Rad Molecular Imager Gel Doc XR⁺凝胶成像系统)、振荡器 (IKA MS3 digital)、恒温水浴锅等。

1.2 标本采集

玉米象的采集和保存: 玉米象标本来自喀什市售大米。观察外观形态, 鉴定为鞘翅目象甲科昆虫, 再结合雌雄外生殖器特征进行形态学准确鉴定。将玉米象整理后保存于含有 99% 酒精的离心管中, 并放置于冰箱 4℃ 的冷藏保存, 做为 DNA 提取材料。

1.3 基因组 DNA 提取和基因片段 PCR 扩增

1.3.1 基因组 DNA 的提取 DNA 提取参照邹志文等 (2011) Chelex 改进方法, 即将样品用双蒸水清洗干净 (清洗数次, 期间涡旋震荡取出杂质), 将清洗干净的样品置于洁净滤纸上干燥; 干燥过后挑取单头 (取腹胸去鞘翅) 样品置于 1.5 mL 的离心管中, 用灭菌玻璃研磨棒充分研磨; 加灭菌双蒸水 0.5 mL, 涡旋混匀, 冰箱 -20℃ 冷却 10 min 后, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 重复 2 至 3 次; 沉淀中加入 150 μL 悬浮好的 5% 的 Chelex-100 溶液, 56℃ 水浴 2 h; 涡旋 5 至 10 s, 置 100℃ 加热 10 min; 取出后涡旋溶液 5 至 10 s, 10 000 r/min 离心 5 min, 上清液即可作为 PCR 反应的 DNA 模板, -20℃ 保存备用 (Walsh, 1991)。此法提取的 DNA 无法电泳检测 (周月琴等, 2003)。

1.3.2 基因片段 PCR 扩增 引物由北京奥科生物技术公司合成, 具体引物序列及参考文献如表 1 所示。扩增体系总体积为 25 μL, 包括 1.5 U *Taq* 酶, 0.25 mmol/L dNTP, 1×反应缓冲液, 2.0 mmol/L Mg^{2+} , 上下游引物各为通用引物 0.3 μmol/L, DNA 模板 50 ng。反应程序为: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 45 s, 55℃ 或 58℃

表 1 PCR 扩增引物设计及其参考文献
Table 1 PCR primer design and its reference

扩增区域 Amplification region	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	参考文献 References
ITS1	CAS18sF1	TACACACCGCCCGTCGCTACTA	Ji <i>et al.</i> , 2003
	CAS5p8sB1d	ATGTGCGTTCRAAATGTCGATGTTCA	
ITS2	CAS5p8sFc	TGAACATCGACATTTYGAACGCACAT	Ji <i>et al.</i> , 2003
	CAS28sB1d	TTCTTTTCCTCCSCTTAYTRATATGCTTAA	
Cytb	CB-J-10933	TAYGTHYTACCNTGAGGNCAAATATC	Simon <i>et al.</i> , 1994
	CB-N-11367	ATWACWCCTCCTAATTTATTAGGAAT	
CO	COISz-F	GGGCTGAATTAGGGAATCCT	Kim and Lee, 2008; Kamitani, 2011; 杨倩倩等, 2012 ; Corrêa <i>et al.</i> , 2016
	COISz-R	CTCCTGTTAATCCCCCGATA	
CO	COIISz-F	TGCTTCAAGATAGAGCCTCTCC	Corrêa <i>et al.</i> , 2016
	COIISz-R	GGTTTGCTCCACAGATTTTCAG	

(ITS1) 退火 1 min , 72 延伸 1 min , 循环 40 次 , 循环结束后 72 延伸 7 min。PCR 产物直接送到北京博迈德生物技术公司进行测序(双脱氧法)。

1.4 序列数据处理及分子系统树构建

测序获得的基因序列用 Dnastar Package 中的 Editseq 软件进行正反链拼接匹配校正 , 将拼接好的序列保存为 FASTA 格式。在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 网站上运行 BLAST 程序进行序列同源性比较 , 确定为昆虫的 ITS1、ITS2、Cytb、CO 、CO 基因。联合从 GeneBank 中选用的 16 条同源序列 (表 2) , 用 ClustalX1.83 软件进行比对。用分子进化遗传分析软件 MEGA3.1 (Kumar *et al.* , 2004 ; 金倩和张爱兵 , 2013) 分析各物种间 DNA 序列差异 , 计算核苷酸使用频率。基于 Kimura-2-Parameter 模型 , 用 NJ (Neighbour-Jioning) 法构建分子系统树 , 1 000 次循环估计系统树中节点的自举置信水平 (Bootstrap confidence level , BCL)。

2 结果与分析

2.1 形态学分类鉴定

玉米象的分类地位已经明确 , 属于完全变态昆虫 , 可分为卵、幼虫、蛹、成虫四个发育形态 ,

表 2 GeneBank 中与玉米象 ITS1、ITS2、Cytb、CO I、CO II 基因序列相关的部分数据
Table 2 Partial sequence associated with the ITS1, ITS2, Cytb, CO I, CO II of leaf beetle in GeneBank

科名 Familiy	种名 Species	GeneBank 登录号 GeneBank accession No.	基因名称 Gene name
Curculionidae	<i>S. zeamais</i>	AF276518.1	ITS1
Curculionidae	<i>S. oryzae</i>	AH011302.2	
Curculionidae	<i>S. granarius</i>	EU727185.1	
Curculionidae	<i>S. zeamais</i>	AF276518.1	ITS2
Curculionidae	<i>S. zeamais</i>	KX190117.1	
Curculionidae	<i>S. oryzae</i>	AH011302.2	
Curculionidae	<i>Polytus mellerborgi</i>	KJ939357.1	Cytb
Curculionidae	<i>S. zeamais</i>	KX373614.1	
Brentidae	<i>Ischnopterapion modestum</i>	KY083904.1	
Bombycidae	<i>Bombyx mandarina</i>	AB070263.1	CO
Curculionidae	<i>S. zeamais</i>	KX373614.1	
Curculionidae	<i>S. zeamais</i>	AY131100.1	
Curculionidae	<i>S. oryzae</i>	KX641892.1	CO
Curculionidae	<i>S. linearis</i>	AY131102.1	
Curculionidae	<i>S. zeamais</i>	AY014881.1	
Curculionidae	<i>S. zeamais</i>	KX373614.1	CO
Curculionidae	<i>S. granarius</i>	M83970.1	
Curculionidae	<i>Laparocerus edaphicus</i>	KX551744.1	

生活周期短,外部形态特征与米象极为相似,生活史中各阶段特征描述如表 3 所示。玉米象雄虫阳茎背面扁平,有两条平行的纵凹沟;雌虫“Y”形骨片两侧臂的末端尖细,两侧臂的间距远大于两侧臂宽之和,如图 1 (E, F) 所示。

2.2 玉米象 *ITS1*、*ITS2*、*Cytb*、*COI*、*COII* 序列分析

2.2.1 玉米象 *ITS1*、*ITS2*、*Cytb*、*COI*、*COII* 序列碱基含量分析

将所测序列进行拼接校对,扩增序列 *ITS1*、*ITS2*、*Cytb*、*COI*、*COII*

的序列分析如表 4 所示。在 NCBI 网站上运行 BLAST 程序,结果显示所测序列与昆虫的 *ITS1*、*ITS2*、*Cytb*、*COI*、*COII* 基因有很高的相似性,因此可以确定测定序列为 *ITS1*、*ITS2*、*Cytb*、*COI*、*COII* 基因序列。通过与 GeneBank 中的 *COI* 基因全序列进行比较,结合 GeneBank 中下载的与该 *ITS1*、*ITS2*、*Cytb*、*COI*、*COII* 序列同源性较高的 16 条玉米象的序列(在表 2 中列出),用 ClustalX1.83 软件进行比对,将非保守区域去除,仅以表 4 中

表 3 玉米象卵、幼虫、蛹、成虫特征

Table 3 Characteristics of egg, larva, pupa and adult of *Sitophilus zeamais*

虫态 Developmental stage	形态特征描述 Morphological feature description	参考文献 References
卵 Egg	椭圆形,长约 0.65-0.70 mm,宽约 0.28-0.29 mm,乳白色,半透明,下端稍圆大,上端逐渐狭小,上端着生帽状圆形小隆起;谷象的卵与其相似	熊继文和蒙黔英,1985
幼虫 Larva	体长 2.5-3.0 mm,有 13 节体节,乳白色,体多横皱,体表有壳,壳为短圆形,背面弯曲隆起;腹面平坦,全体肥大粗短,略呈半球形,无足;头小,淡褐色,唇基侧突并且较小,前端微微发尖,略呈楔形,谷象幼虫与其相似	刘永平,1982
蛹 Pupa	体长 3.5-4.0 mm,椭圆形,乳白色至褐色。头部圆形,喙状部伸达中足基节。前胸背板上有小突起 8 对,其上各生 1 根褐色刚毛,腹部 10 节,腹末有肉刺 1 对	沈祥林,1983
成虫 Adult	体长 2.9-4.2 mm。体暗褐色,鞘翅常有 4 个橙红色椭圆形斑(图 1)。喙长,除端部外,密被细刻点。触角位于喙基部之前,柄节长,索节 6 节,触角棒节间缝不明显。前胸背板前端缩窄,后端约等于鞘翅之宽,背面刻点圆形,沿中线刻点多于 20 个。鞘翅行间窄于行纹刻点。前胸和鞘翅刻点上均有一短鳞毛。后翅发达,能飞。雄虫阳茎背面有两纵沟,雌虫“Y”字形骨片两臂较尖	许永金,1979;吕剑秋,1980;黄建国,1996;徐胜力,1997

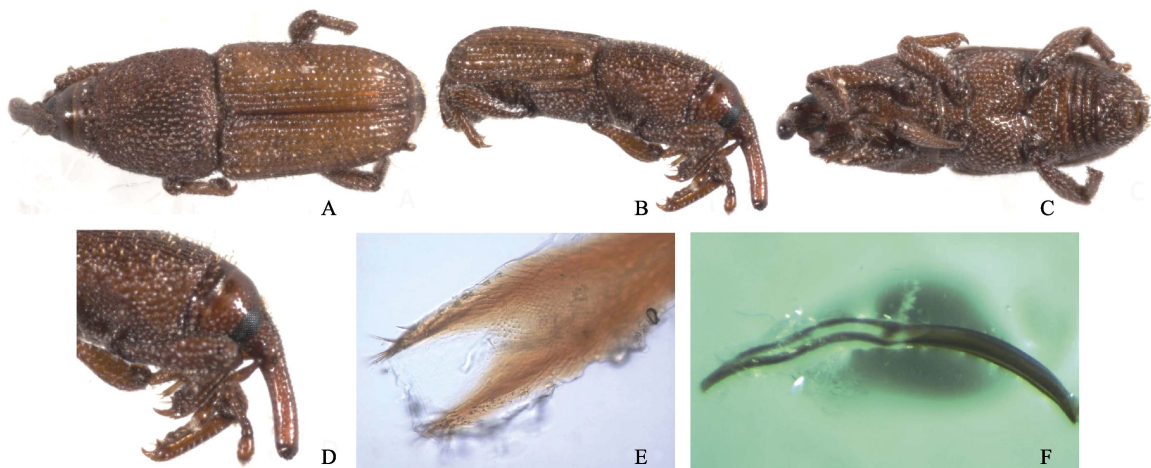


图 1 玉米象的形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of *Sitophilus zeamais*

A. 背面; B. 侧面; C. 腹面; D. 头部; E. 雌性生殖器; F. 雄性生殖器。
A. Back; B. Lateral; C. Ventral; D. Head; E. Female genitalia; F. Male genitalia.

表 4 核苷酸使用频率统计
Table 4 Nucleotide usage frequency statistics

基因名	材料名称	GeneBank 登录号	片段长度 (bp)	A/T 含量比	AT 含量 (%)	GC 含量 (%)
Gene name	Material name	GeneBank No.	Fragment length	A/T content ratio	AT content	GC content
<i>ITS1</i>	玉米象 <i>S. zeamais</i>	MH158230	1 001	0.81	54.3	45.7
<i>ITS2</i>	玉米象 <i>S. zeamais</i>	MH158231	595	0.99	53.6	46.4
<i>Cytb</i>	玉米象 <i>S. zeamais</i>	MH156200	474	1.39	70.0	30.0
<i>CO</i>	玉米象 <i>S. zeamais</i>	MH156201	920	0.83	66.7	33.3
<i>CO</i>	玉米象 <i>S. zeamais</i>	MH156202	565	1.04	69.7	30.3

的序列长度进行分析。

通过 DNAMAN 软件测定分析了 *ITS1*、*ITS2*、*Cytb*、*CO*、*CO* 基因碱基序列。测序拼接后得到序列片段长度如表 4 所示。序列分析结果显示：*ITS1*、*ITS2*、*Cytb*、*CO*、*CO* 基因所有位点中 AT 碱基含量和 GC 碱基含量如表 4 所示；其中 *Cytb*、*CO*、*CO* 基因，AT 含量较高，AT 的含量分别为 70.0%、66.7%、69.7%，明显高于 GC 含量，表现明显的 A+T 碱基偏嗜，且 A 与 T 含量相当，符合昆虫线粒体基因碱基组成的基本特征。通过对玉米象 *ITS1*、*ITS2*、*Cytb*、*CO*、*CO* 基因序列分析表明，所得 5 个基因序列均能在分子水平上对玉米象进行检测分析。

2.2.2 系统进化树 将获得的玉米象 *S. zeamais* 成虫样本的 *ITS1*、*ITS2*、*Cytb*、*CO*、*CO* 序列在 NCBI 中进行比对，可获得得分高低和相似度高低排列表，每个基因最高得分的最高相似度分别为：*ITS1* (97%)、*ITS2* (99%)、*Cytb* (99%)、*CO* (99%)、*CO* (100%)，结果显示均和玉米象 *S. zeamais* 相关序列的相似性最高，因此每个基因均可以确定为玉米象 *S. zeamais* 相关基因序列。结合 GeneBank 中下载的与该虫成虫 *ITS1*、*ITS2*、*Cytb*、*CO*、*CO* 序列同源性较高的 16 条相关的序列，用 ClustalX1.83 软件进行比对，用 MEGA6.0 构建玉米象科部分属种每个基因的 NJ 分子系统树，1 000 次循环估计系统树中节点的自举置信水平，得到 *ITS1*、*ITS2*、*Cytb*、*CO*、*CO* 相关基因的 NJ 系统树。从分子系统树可以看出，本实验样品的 *ITS1*、*ITS2*、*Cytb*、*CO*、*CO* 基因序列均和玉米象相关基因序列具有很高的相似性，并且和已知的玉米象 *S. zeamais* 相关序列以较高置信值聚在一起，数据比对和建树聚合结果均显示该样品为玉米象 *S. zeamais*，说明这些基因序列可作为 DNA 条形码用于玉米象的快速鉴定。

3 小结与讨论

DNA 条形码技术的不断成熟，在各个领域得到了十分广泛的科学应用。形态学鉴定在实际应用中存在诸多局限，DNA 条形码技术更可以发挥其优势，以弥补传统的昆虫鉴定方法的不足之处，为昆虫的鉴定提供了简单快速准确的鉴定

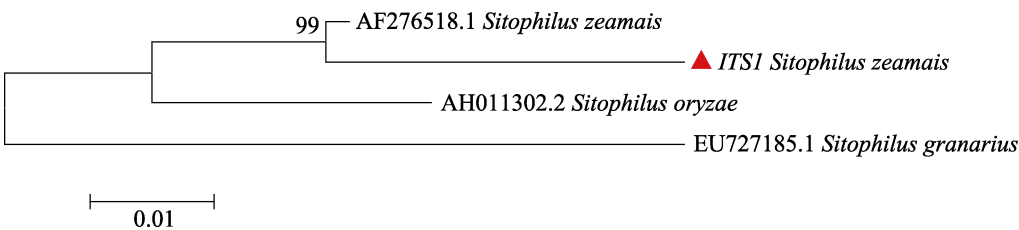


图 2 与玉米象相关的部分种类的 *ITS1* 基因 NJ 分子系统树
Fig. 2 *ITS1* gene NJ phylogenetic tree of partial species related to *Sitophilus zeamais*

图中数字表示置信度；我们的样本用实心三角标出，*ITS1 S. zeamais*。
Integer indicates bootstrap confidence values, and our sample, *ITS1 S. zeamais*, is marked in solid triangle.

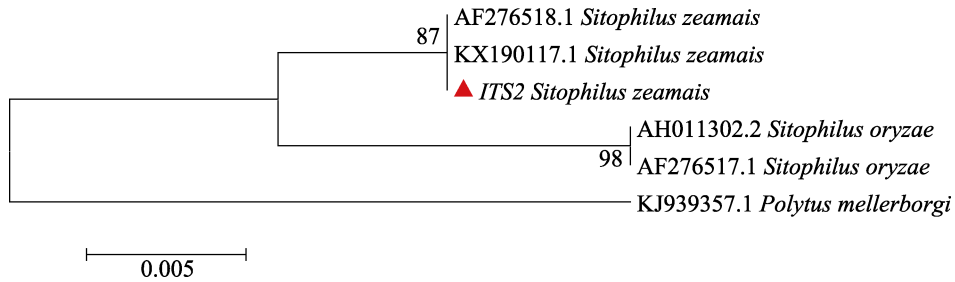


图 3 与玉米象相关的部分种类的 ITS2 基因 NJ 分子系统树

Fig. 3 ITS2 gene NJ phylogenetic tree of partial species related to *Sitophilus zeamais*

图中数字表示置信度；我们的样本用实心三角标出，ITS2 *S. zeamais*。

Integer indicates bootstrap confidence values, and our sample, ITS2 *S. zeamais*, is marked in solid triangle.

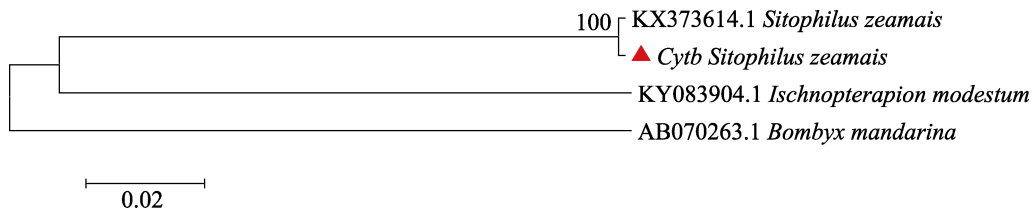


图 4 与玉米象相关的部分种类的 Cytb 基因 NJ 分子系统树

Fig. 4 Cytb gene NJ phylogenetic tree of partial species related to *Sitophilus zeamais*

图中数字表示置信度；我们的样本用实心三角标出，Cytb *S. zeamais*。

Integer indicates bootstrap confidence values, and our sample, Cytb *S. zeamais*, is marked in solid triangle.

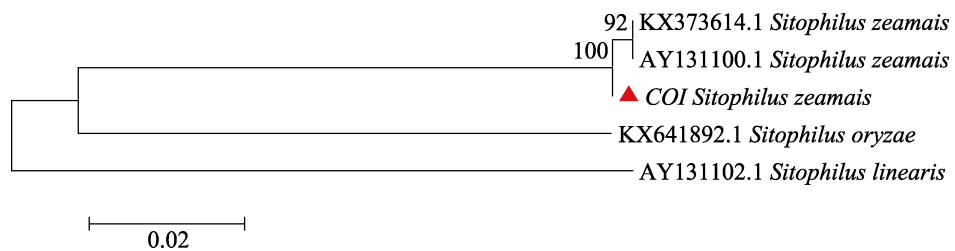


图 5 与玉米象相关的部分种类的 COI 基因 NJ 分子系统树

Fig. 5 COI gene NJ phylogenetic tree of partial species related to *Sitophilus zeamais*

图中数字表示置信度；我们的样本用实心三角标出，COI *S. zeamais*。

Integer indicates bootstrap confidence values, and our sample, COI *S. zeamais*, is marked in solid triangle.

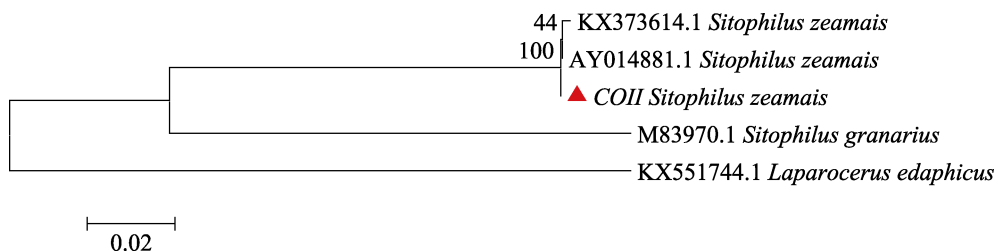


图 6 与玉米象相关的部分种类的 COII 基因 NJ 分子系统树

Fig. 6 COII gene NJ phylogenetic tree of partial species related to *Sitophilus zeamais*

图中数字表示置信度；我们的样本用实心三角标出，COII *S. zeamais*。

Integer indicates bootstrap confidence values, and our sample, COII *S. zeamais*, is marked in solid triangle.

方法,同时为分类学家发现隐种和新种提供了新方法。

虽然形态学鉴定在实际应用中存在诸多局限,但是脱离了形态分类,DNA 条形码技术将无法进行,即形态分类的大致类群是设计和检索扩增 DNA 条形码序列引物的基础。因此本文利用分类学特征(外在形态特征,如形状、大小、颜色等)对物种进行初步鉴定后,再结合 DNA 条形码鉴定是更加高效准确的鉴定方法。

玉米象对仓储粮食的危害很大且防治困难,而害虫的防治必须要以害虫准确鉴定为基础,因此要对玉米象进行防治需要首先对其进行快速准确鉴定。本研究克服了玉米象和米象、谷象的形态特征极为相似;准确鉴定必须要获得成虫标本,将成虫解剖取出外生殖器,进行清洁整理然后在解剖镜下观察鉴定;形态学鉴定对标本质量、数量要求较高,并要求鉴定者熟练掌握相应生物领域的基础知识等一系列问题。利用 DNA 条形码技术,结合形态学分类方法,实现了玉米象的快速准确鉴定。玉米象 *ITS1*、*ITS2*、*Cytb*、*CO*、*CO* 基因,其中每个基因都可以用来作为实现该虫快速鉴定的 DNA 条形码。本研究充实了玉米象 *ITS1*、*ITS2*、*Cytb*、*CO*、*CO* 基因序列在网络数据库中的记录,为快速鉴定提供参考序列。

由于未收集到米象和谷象标本,未进行本文中所述基因的扩增,但根据不同物种相应基因种间和种内差异水平理论,可以确定本文中玉米象的相应基因序列与米象和谷象的相应基因序列存在的差异足够将它们区分出来,即使是相应害虫的幼虫也可以通过种间和种内差异水平理论区分开来。

4 结论

通过提取玉米象 DNA,检索相应基因引物进行 PCR 扩增并测序,获得了该虫的 *ITS1*、*ITS2*、*Cytb*、*CO*、*CO* 基因的序列,序列比对和 NJ 树分析表明这些基因序列都可作为 DNA 条形码用于玉米象的快速鉴定,能够实现该虫的快速准确鉴定。

参考文献 (References)

- Bai XG, Zhao YJ, Cao Y, Wang DX, Zhou YX, 2002. Storage Pest and Control. Beijing: Science Press. 1-456. [白旭光, 赵英杰, 曹阳, 王殿轩, 周玉香, 2002. 储藏物害虫与防治. 北京: 科学出版社. 1-456.]
- Cao ZD, 1980. Identification of adult *Sitophilus oryzae* and *Sitophilus zeamais*. *Grain Processing*, (10): 13-18. [曹志丹, 1980. 玉米象和米象成虫的鉴别. 粮食加工, (10): 13-18.]
- Corrêa AS, Vinson CC, Braga LS, Guedes RNC, De Oliveira LO, 2016. Ancient origin and recent range expansion of the maize weevil *Sitophilus zeamais*, and its genealogical relationship to the rice weevil *S. oryzae*. *Bulletin of Entomological Research*, 107(1): 9-20.
- Feng CL, 2002. Discussion on the resistance of stored grain insect pests and its ways of overcoming. *Qilu Food*, (4): 61-62. [冯存岭, 2002. 浅谈储粮害虫的抗药性及其克服途径. 齐鲁粮食, (4): 61-62.]
- 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 & Biotechnology*, 3(5): 294-299.
- Fu CB, Zhang X, 1996. Research progress on control of stored grain insects with plant substances. *Grain Storage*, (5): 6-12. [付昌斌, 张兴, 1996. 利用植物性物质防治储粮害虫研究进展. 粮食储藏, (5): 6-12.]
- Fu JG, Yang XJ, Qian L, An YL, 2012. Application of plant DNA barcoding in inspection and quarantine. *Plant Quarantine*, 26(2): 64-69. [伏建国, 杨晓军, 钱路, 安榆林, 2012. 植物 DNA 条形码技术在出入境检验检疫领域的应用. 植物检疫, 26(2): 64-69.]
- 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 of the United States of America*, 103(4): 968-971.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(1512): 313-321.
- Hebert PDN, Ratnasingham S, Dewaard JR, 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(Suppl. 1): S96-S99.
- Huang HP, Yang LY, Wang GF, Huang JS, 2006. The application of rDNA and mtDNA in insect phylogeny and fauna. *Journal of South China University of Tropical Agriculture*, 12(4): 45-49. [黄华平, 杨腊英, 王国芬, 黄俊生, 2006. rDNA 和 mtDNA 在昆虫系统发育与区系研究中的应用. 热带生物学报, 12(4): 45-49.]
- Huang JG, 1982. Biological studies (preliminary report) of

- Sitophilus oryzae* (Linnaeus) and *Sitophilus zeamais* Motschulsky. *Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition)*, (1): 1–10. [黄建国, 1982. 米象、玉米象生物学的研究(初报). 河南工业大学学报:自然科学版, (1): 1–10.]
- Huang JG, 1996. Identification and control methods of three kinds of weevil. *Grain Technology and Economy*, (1): 12–13. [黄建国, 1996. 三种象虫的鉴定与防治方法. 粮食科技与经济, (1): 12–13.]
- Hunkapiller PD, O'Donnell AE, 1967. A taxonomic separation of larvae of the genus *Sitophilus* by head capsule morphology (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 40(3): 435–440.
- Jin Q, Zhang AB, 2013. Distance-based DNA barcoding methods for insects. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(1): 283–287. [金倩, 张爱兵, 2013. 昆虫 DNA 条形码分析中的距离方法. 应用昆虫学报, 50(1): 283–287.]
- Ji YJ, Zhang DX, He LJ, 2003. Evolutionary conservation and versatility of a new set of primers for amplifying the ribosomal internal transcribed spacer regions in insects and other invertebrates. *Molecular Ecology Resources*, 3(4): 581–585.
- Kamitani S, 2011. DNA barcodes of Japanese leafhoppers. *Esakia*, (50): 81–88.
- Kim H, Lee S, 2008. Molecular systematics of the genus *Megoura* (Hemiptera: Aphididae) using mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecules & Cells*, 25(4): 510–522.
- Kumar S, Tamura K, Nei M, 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5(2): 150–163.
- Li LS, 2009. *Stored Product Entomology*. Chongqing: Chongqing Press. 1–371. [李隆术, 2009. 储藏物昆虫学. 重庆: 重庆出版社. 1–371.]
- Li QQ, Li DY, Duan YQ, Lu JM, Liu XF, Cao N, Ye H, 2010. Application of DNA barcoding in Lepidopteran insects. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 22(4): 307–312. [李青青, 李地艳, 段焰青, 李加敏, 刘晓飞, 曹能, 叶辉, 2010. DNA 条形码在鳞翅目昆虫中的应用. 生命科学, 22(4): 307–312.]
- Liang F, Zhao JP, Liang GQ, Hu XN, 2007. The role of morphology and molecular biology in insect identification. *Plant Quarantine*, 21(4): 243–244. [梁帆, 赵菊鹏, 梁广勤, 胡学难, 2007. 浅谈形态学和分子生物学在昆虫鉴定中的作用. 植物检疫, 21(4): 243–244.]
- Liang YH, Wang DQ, 2013. Integrated control of *Sitophilus zeamais* in corn storage. *Modernizing Agriculture*, (11): 6–7. [梁英华, 王登齐, 2013. 玉米种子仓储害虫玉米象的综合防治. 现代农业, (11): 6–7.]
- Liu XY, 2009. Problems and countermeasures in the prevention and control of stored grain pests. *Modern Rural Science and Technology*, (9): 4–4. [刘晓宇, 2009. 浅谈储粮害虫防治工作存在的问题及对策. 现代农村科技, (9): 4–4.]
- Liu YP, 1982. Identify the larvae of three species from the genus *Sitophilus* by head shape. *Plant Quarantine*, (6): 18–19. [刘永平, 1982. 从头壳形态区别 *Sitophilus* 属的三种幼虫. 植物检疫, (6): 18–19.]
- Liu YP, Zhang XY, Zhang SF, 1983. Study on interspecific competition between *Sitophilus granarius* and *Sitophilus zeamais*. *Plant Quarantine*, (5): 36–41. [刘永平, 张新月, 张生芳, 1983. 谷象和玉米象种间竞争的研究. 植物检疫, (5): 36–41.]
- Luo LY, Hu KM, Fang BQ, 1982. The distribution and biology of *Sitophilus oryzae* and *Sitophilus zeamais* in Guizhou. *Grain Storage*, (1): 20–22. [罗禄怡, 胡开梅, 方宝庆, 1982. 贵州米象玉米象的分布及生物学. 粮食储藏, (1): 20–22.]
- Lv JQ, 1980. The difference between *Sitophilus oryzae* and *Sitophilus zeamais*. *Entomological Knowledge*, 25(3): 3–3. [吕剑秋, 1980. 玉米象和米象的区别. 昆虫知识, 25(3): 3–3.]
- Qian ZX, 1989. Preliminary study on the relationship between protein content of wheat and resistance to *Sitophilus zeamais*. *Hubei Agricultural Sciences*, (2): 12–13. [钱祖香, 1989. 小麦蛋白质含量与抗玉米象关系的初步研究. 湖北农业科学, (2): 12–13.]
- Robert CE, 2013. UPPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, 10(10): 996–1000.
- Shen XL, 1983. Identification, living habits and control of maize weevil (*Sitophilus zeamais* Motschulsky). *Journal of Zhengzhou Grain College*, (1): 73–75. [沈祥林, 1983. 玉米象的鉴别、生活习性和防治. 郑州粮食学院学报, (1): 73–75.]
- Shen ZP, 1996. Status and Prospect of fumigation and grain protectant in controlling stored grain pests. *Journal of Jilin Grain College*, (1): 12–18. [沈兆鹏, 1996. 熏蒸剂和谷物保护剂防治储粮害虫现状及前景. 吉林粮食高等专科学校学报, (1): 12–18.]
- Shen ZP, 1997. Integrated management of stored insect pests. *Warehouse Management and Technology*, (1): 27–29. [沈兆鹏, 1997. 仓储害虫综合治理. 仓储管理和技术, (1): 27–29.]
- 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.
- Song N, Liu J, Cai WZ, Zhao ZY, 2013. Application of DNA barcoding in insect taxonomy. *Sichuan Journal of Zoology*, 32(3): 470–474. [宋南, 刘杰, 彩万志, 赵忠懿, 2013. DNA 条形码在昆虫分类中的应用. 四川动物, 32(3): 470–474.]
- Tang JY, Huang SZ, 1989. Genetic evaluation of insect resistance in rice-(nine), *Sitophilus zeamais*, *Sitophilus oryzae*, and *Sitophilus granarius*. *Fujian Science and Technology of Rice and Wheat*, (3): 41–46. [唐建阳, 黄书针, 1989. 水稻抗性遗传评价-(九)米象、玉米象和谷象. 福建稻麦科技, (3): 41–46.]
- Tautz D, Arctander P, Minelli A, Thomas RH, Vogler AP, 2002. DNA points the way ahead in taxonomy. *Nature*, 418(6897): 479–479.
- Ukeh DA, Woodcock CM, Pickett JA, Birkett MA, 2012. Identification of host kairomones from maize, *Zea mays*, for the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Journal of Chemical Ecology*,

- 38(11): 1402–1409.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R, 1991. Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10(4): 506–513.
- Wang DX, Zheng Z, Yuan YK, Liu KX, Lu Q, 2016. Detection and calculation on developmental zero temperatures of *Sitophilus oryzae* (Linnaeus) and *Sitophilus zeamais* Motschulsky. *Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition)*, (2): 11–15. [王殿轩, 郑祯, 袁玉珂, 刘凯霞, 陆群, 2016. 米象和玉米象发育始点温度的测定与计算. 河南工业大学学报(自然科学版), (2): 11–15.]
- Wang YC, Cui J, 1983. Some methods for controlling stored grain insects. *Grain Processing*, (1): 40–42. [王银成, 崔健, 1983. 谈谈储粮害虫防治的几种方法. 粮食加工, (1): 40–42.]
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PD, 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 360(1462): 1847–1857.
- Wei JH, Wu WR, Yu LW, Lin XY, Li W, 2010. Application of DNA barcoding in biological classification. *Journal of Guangdong Pharmaceutical College*, 26 (4): 430–433. [韦健红, 吴文如, 喻良文, 林小桦, 李薇, 2010. DNA 条形码技术在生物分类中的应用. 广东药学院学报, 26(4): 430–433.]
- Wu YP, Ding L, Li J, Wu CS, Fan RJ, Zhu CD, 2011. DNA barcoding: current progresses and discussions. *Journal of Environmental Insect*, 33(1): 99–106. [武宇鹏, 丁亮, 李捷, 李捷, 武春生, 范仁俊, 朱朝东, 2011. DNA 条形码的应用进展及讨论. 环境昆虫学报, 33(1): 99–106.]
- Xiao JH, Xiao H, Huang DW, 2004. DNA barcoding: new approach of biological taxonomy. *Acta Zoologica Sinica*, 50(5): 852–855. [肖金花, 肖晖, 黄大卫, 2004. 生物分类学的新动向-DNA 条形码编码. 动物学报, 50(5): 852–855.]
- Xiong JW, Meng QY, 1985. The effect of different temperatures and foodstuffs on the growth, development, reproduction and morphology of maize weevil (*Sitophilus zeamais* Motschulsky). *Journal of Guizhou Agricultural College*, (2): 37–42. [熊继文, 蒙黔英, 1985. 不同温度和饲料对玉米象生长, 发育, 繁殖及形态的影响. 山地农业生物学报, (2): 37–42.]
- Xu SL, 1997. Grain pests in storage-maize weevil (*Sitophilus zeamais* Motschulsky) and its control. *Xinjiang Agricultural Science and Technology*, (6): 38–38. [徐胜利, 1997. 家庭贮藏害虫-玉米象及其防治. 新疆农业科技, (6): 38–38.]
- Xu YJ, 1979. On the changes and identification of the academic names of maize weevil (*Sitophilus zeamais* Motschulsky). *Plant Quarantine*, (2): 41–44. [许永金, 1979. 关于米象与玉米象学名变迁和鉴别. 植物检疫, (2): 41–44.]
- Yang QQ, Li ZH, Wu W, Liu LJ, 2012. Advance and application of mtDNA COI barcodes on insects. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(6): 1687–1695. [杨倩倩, 李志红, 伍祎, 柳丽君, 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.]
- Yang ZY, Huang P, Wu GX, 1989. Observation on the karyotypes of *Sitophilus oryzae* and *Sitophilus zeamais* and their hybrid offsprings. *Acta Entomologica Sinica*, 32(4): 406–409. [杨志远, 黄培, 吴国雄, 1989. 米象, 玉米象及其杂交后代染色体的观察研究. 昆虫学报, 32(4): 406–409.]
- Yin WY, Wang XP, 2002. Present situation on damage and chemical control of stored insect pests. *Hunan Agricultural Sciences*, (6): 54–56. [尹文雅, 王小平, 2002. 仓储害虫的为害及化学防治现状. 湖南农业科学, (6): 54–56.]
- Zhang JD, Zhang WJ, Xi MY, 1995. A preliminary report on the occurrence and control of *Sitophilus zeamais*. *Plant Protection*, 21(5): 26–27. [张晶东, 张文解, 郝满义, 1995. 玉米象的发生及防治研究初报. 植物保护, 21(5): 26–27.]
- Zhang Y, Guo XH, Liu GC, Zhang Z, 2011. Application of DNA barcodes to molecular systematics of Coleoptera. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(2): 410–416. [张媛, 郭晓华, 刘广纯, 张卓, 2011. DNA 条形码在鞘翅目昆虫分子系统学研究中的应用. 应用昆虫学报, 48(2): 410–416.]
- Zhao GY, Li H, Yang HL, Cai WZ, 2014. Application of DNA barcoding in entomology: a review. *Acta Phytophylacica Sinica*, 41(2): 129–141. [赵广宇, 李虎, 杨海林, 彩万志, 2014. DNA 条形码技术在昆虫学中的应用. 植物保护学报, 41(2): 129–141.]
- Zhou LB, Jiang XL, Guan LH, 1998. Identification of four kinds of storage of the rice weevil infestation. *Entomological Knowledge*, 25(2): 114–115. [周力兵, 蒋小龙, 管良华, 1998. 为害仓贮的四种米象的识别. 昆虫知识, 25(2): 114–115.]
- Zhou QS, Zhang TX, Yu F, Luo AR, Niu ZQ, Zhu ZD, Zhang YZ, 2013. Application of DNA barcoding to hymenopteran taxonomy. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(1): 19–28. [周青松, 张同心, 于芳, 罗阿蓉, 牛泽清, 朱朝东, 张彦周, 2013. DNA 条形码在膜翅目昆虫中的应用分析. 应用昆虫学报, 50(1): 19–28.]
- Zhou YQ, Zhu W, Liu Z, Wu WQ, 2003. A quick method of extraction of DNA by Chelex-100 from trace bloodstains. *Fudan University Journal of Medical Sciences*, 30(4): 379–380. [周月琴, 朱伟, 刘志萍, 吴文庆, 2003. 用 Chelex-100 快速提取微量血痕中的 DNA. 复旦学报医学版, 30(4): 379–380.]
- Zhu ZH, Ye H, Zhang ZY, 2005. Molecular identification of six *Bactrocera* species (Diptera: Tephritidae) based on mtDNA. *Acta Entomologica Sinica*, 48(3): 386–390. [朱振华, 叶辉, 张智英, 2005. 基于 mtDNA Cytb 的六种果实蝇的分子鉴定(双翅目:实蝇科). 昆虫学报, 48(3): 386–390.]
- Zou ZW, Zhang SQ, Xin TR, Yang XQ, Yang DL, Xia B, 2011. Extraction of DNA from single mite by promoted Chelex-100 method. *Journal of Nanchang University (Natural Science)*, 35(6): 564–567. [邹志文, 张素卿, 辛天蓉, 杨小强, 杨登录, 夏斌, 2011. 一种改进的 Chelex-100 法提取单头螨 DNA. 南昌大学学报理科版, 35(6): 564–567.]