

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2012.03.006

大小蠹来源地的 COI 基因标记

殷玉生^{1*}, 张帆¹, 钱路², 郑斯竹², 安榆林²

¹ 江阴出入境检验检疫局, 江苏 江阴 214431; ² 江苏出入境检验检疫局, 江苏 南京 210000

摘要:【背景】大小蠹属昆虫是重要的林木害虫,我国口岸有多次截获记录,确定大小蠹的来源地可以有针对性地加强对大小蠹的检验检疫工作。【方法】测定了 5 种高风险大小蠹(红脂大小蠹、红翅大小蠹、中欧山松大小蠹、落叶松大小蠹和间大小蠹)共 12 个样本的线粒体 DNA 细胞色素氧化酶 C 亚基 I 基因(COI)的部分序列。【结果】利用巢式 PCR 技术,在不同种类的大小蠹样本中均获得了 530 bp 的靶标片段,比对分析显示,不同种大小蠹之间的 COI 序列差异显著,同种大小蠹不同个体之间的 COI 序列存在一定的差异,但差异不显著。系统进化树分析结果显示,大小蠹可以明显分为 2 支,其中,间大小蠹单独为一分支,另一分支由红脂大小蠹、红翅大小蠹、中欧山松大小蠹和落叶松大小蠹组成;同时,同种大小蠹不同个体的来源情况在进化树中有一定体现。【结论与意义】COI 基因可以较好地反映样本的来源地,对今后制定大小蠹的具体检验检疫措施有实际指导意义。

关键词: 大小蠹属; COI 基因; 来源地; 分子标记

Investigating the provenance of *Dendroctonus* using COI gene

Yu-sheng YIN^{1*}, Fan ZHANG¹, Lu QIAN², Si-zhu ZHENG², Yu-lin AN²

¹ Jiangyin Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Jiangyin, Jiangsu 214431, China;

² Jiangsu Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing, Jiangsu 210000, China

Abstract: 【Background】*Dendroctonus* spp., the noxious forest pests, have been repeatedly intercepted in many ports in China. For custom officers, the main challenge remains to determine the provenance of these insects. 【Method】Using nested PCR, the cytochrome C oxidase subunit I gene (COI) in mtDNA was examined for 12 samples from *Dendroctonus valens*, *D. rufipennis*, *D. ponderosae*, *D. simplex* and *D. adjunctus*. 【Result】The nested PCR showed variation between and within groups for a 530 portion of COI. Molecular phylogenetic analysis based on COI gene showed that *Dendroctonus* spp. could be divided into two clades. Clade 1 included *D. adjunctus*, and Clade 2, *D. valens*, *D. rufipennis*, *D. ponderosae* and *D. simplex*. The provenance of the specimens analyzed in this study can be identified within the evolutionary tree. 【Conclusion and significance】The results suggest that COI may help determine the provenance of specimens intercepted in ports thus providing more adequate information to custom officers.

Key words: *Dendroctonus*; COI; source of *Dendroctonus*; molecular markers

大小蠹属 *Dendroctonus* spp. 主要分布在美洲, 已知的 19 个种均为具有经济重要性的种类。大小蠹在短时间内可以达到种群暴发水平,使大量树木死亡,故均被确定为检疫性有害生物。我国纬度与北美相似,气候条件也完全适合大小蠹属昆虫的适生定殖(冉俊祥,2001)。如外来入侵种红脂大小蠹 *Dendroctonus valens* LeConte 20 世纪末随木材贸易传入我国,1999 年在山西暴发成灾,随即蔓延至河北、河南、陕西等地(宋玉双等,2000)。Cai *et al.* (2008)通过分析我国和北美的红脂大小蠹种群的

COI 基因,认为红脂大小蠹是由美国加利福尼亚传入。姚剑等(2010)则认为我国的红脂大小蠹是从北美的不同地方传入。对南松大小蠹 *Dendroctonus frontalis* Zimmerman 进行微卫星检验发现,美国境内南松大小蠹分为东部和西部 2 个组,且有发生亚种的可能性(Schrey *et al.*, 2011)。

我国口岸进境的木材和木质包装来源于不同的国家和地区,大小蠹的来源地也不尽相同,因此,确定大小蠹的来源地对植物检疫工作具有重要的意义。安榆林(2004)通过对各国光肩星天牛 *Ano-*

收稿日期(Received): 2012-05-24 接受日期(Accepted): 2012-07-24
基金项目: 江苏出入境检验检疫局基金课题(2008KJ37); 科技部质检公益性行业科研专项(201110038); 国家科技支撑计划课题(2012BAK11B03)
作者简介: 殷玉生,男,理学硕士。研究方向: 进出境植物检疫
* 通讯作者(Author for correspondence), E-mail: yinysh@vip.tom.com

plophora glabripennis Motschulsky 的 DNA 分子研究,证明了传入美国的光肩星天牛并非来自我国,为我国的对外贸易挽回了巨大损失。刘勇等(2010)通过对采自不同地区、不同寄主的 8 个齿小蠹属 *Ips* 昆虫样本以及其他 7 种小蠹科昆虫样本的线粒体 COI 基因研究证实,基于线粒体 COI 基因的 DNA 条形码技术对齿小蠹属昆虫进行分子鉴定是切实可行的。本试验利用相关分子标记技术,通过对大

小蠹属昆虫 COI 基因的扩增,明确我国大小蠹的来源地,旨在为口岸检疫相关方案的实施提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试样本

供试样本均为不同种类的大小蠹,来自亚洲、北美等地(表 1)。

表 1 供试大小蠹种类

Table 1 Description of the specimens of *Dendroctonus* spp. collected for this analysis

种类 Species	样本编号 Specimens no.	来源地 Provenance of the specimens	采集地 Location of specimens	采集时间 Date of collection
红脂大小蠹 <i>Dendroctonus valens</i>	V1	黄龙山大岭 Huanglongshan	黄龙山大岭,油松 Huanglongshan, <i>Pinus tabulaeformis</i>	—
	V2	—	—	2011
	V3	陕西桥山 Shanxi Qiaoshan	陕西桥山,油松 Shanxi Qiaoshan, <i>Pinus tabulaeformis</i>	2008
	V4	—	—	—
红翅大小蠹 <i>Dendroctonus rufipennis</i>	R1	加拿大 Canada	江苏口岸 Jiangsu	2010
	R2	加拿大 Canada	江苏口岸 Jiangsu	2011
	R3	—	江苏口岸 Jiangsu	—
中欧山松大小蠹 <i>Dendroctonus ponderosae</i>	Pon1	加拿大 Canada	江苏口岸 Jiangsu	2009
	Pon2	阿拉斯加 Alaska	江苏口岸 Jiangsu	2002
	Pon3	—	江苏口岸 Jiangsu	—
落叶松大小蠹 <i>Dendroctonus simplex</i>	S1	阿拉斯加 Alaska	江苏口岸 Jiangsu	—
				2005
间大小蠹 <i>Dendroctonus adjunctus</i>	A1	美国 America	江苏口岸 Jiangsu	

1.2 DNA 提取

大小蠹样本保存在无水乙醇中,利用磁珠法(郑斯竹等,2012)提取样本 DNA。

1.3 PCR 扩增

1.3.1 引物设计 本研究所用的 2 对引物,由金斯瑞生物科技有限公司合成。其中,引物 I 为通用引物,引物 II(内引物)是根据 GeneBank 相关序列设计的引物。

引物 I:上游引物 C1-J-2183 碱基序列为 5'-CAACATTTATTTTGATTTTTTGG-3'(Simon *et al.*, 1994);下游引物 TL2-N-3014 碱基序列为 5'-TC-CAATGCACTAATCTGCCATATTA-3'(Folmer *et al.*, 1994)。扩增片段大小为 800 bp。

引物 II:上游引物碱基序列为 5'-TCGCATAT-TATTAGGCAAGAAAGAG-3';下游引物碱基序列为 5'-AGAAATGTTGTGGGAAGAAAG-3'。扩增片段大小为 550 bp。

1.3.2 巢式 PCR 扩增 在试验过程中,首先使用引物 I 进行扩增,为了提高扩增的效率及灵敏度,

以引物 I 的扩增产物为模板,使用引物 II 进行第 2 轮扩增,即利用巢式 PCR 的方法对样本进行检测。

PCR 反应体系为 25 μL ,包括:DNA 模板($50\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 1 μL 、10 $\times$ buffer 2.5 μL 、dNTP ($2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 2.0 μL 、 MgCl_2 ($25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 2.0 μL 、上下游引物($10\text{ mmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)各 1 μL 、*Ex Taq* DNA 聚合酶(250 U) 0.3 μL 、超纯水 15.2 μL 。

PCR 扩增反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;35 个循环:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s,47 $^{\circ}\text{C}$ 退火 60 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

1.3.3 凝胶电泳分析 取 PCR 反应产物 6 μL ,点样于 1.5% ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的琼脂糖凝胶(含 $0.05\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 上,110 V 电压电泳 25 min 后,在 Bio-Rad Gel Doc EQ 凝胶成像系统下观察扩增结果。

1.4 mtDNA COI 序列的测定与分析

取经电泳检测验证合格的 PCR 产物 50 μL ,直接送金斯瑞生物科技有限公司测序,以 PCR 引物为测序引物进行双向测序。所得序列利用 DNASTar 完成拼接。

1.5 数据分析方法

以 Clustal X 软件(Thompson *et al.*, 1997)对所获得的大小蠹属昆虫 COI 基因片段进行序列比对分析。用分子遗传进化分析软件 MEGA3.0(Kumar *et al.*, 2004),以 Kimura 2-paramete 双参数模型计算种内和种间遗传距离,采用邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统进化树,系统进化树分支的置信度采用自展法重复检测 1000 次。

2 结果与分析

2.1 大小蠹属昆虫 mtDNA COI 基因的序列特征

利用巢式引物对 5 种大小蠹(红脂大小蠹、红

翅大小蠹、中欧山松大小蠹、落叶松大小蠹和间大小蠹)共 12 个样本的 mtDNA COI 基因进行巢式 PCR 扩增,目的条带为 550 bp 左右,对测序后的目的条带进行拼接裁剪后,片段大小为 530 bp(图 1)。

mtDNA COI 序列比对的结果显示,不同种大小蠹之间的基因序列差异较大,同种大小蠹不同样本间也有一定的差异,其中,红翅大小蠹的 3 个样本间以及红脂大小蠹的 4 个样本之间的序列差异显著;中欧山松大小蠹的 3 个样本间差异极小,只有 1 个碱基的差异。所有变异均为碱基置换,没有发生碱基的缺失或插入。

		*	20	*	40	*	
Pon1	:	-	A....G.....	:	53		
Pon2	:	-	A....G.....	:	53		
Pon3	:	-	A....G.....	:	53		
<i>D.ponderos</i>	:	-	A....G.....	:	53		
R1	:	..TG.....	-T.....A....C.....	:	53		
R2	:	..TG.....	-G.....TT.....A.C.....	:	53		
R3	:	..G.....	-.....C.....	:	53		
<i>D.rufipenn</i>	:	C..G.....	-.....A....C.....	:	53		
V1	:	-	..C..A.....T.....G.....	:	53		
V2	:	..G.....	-..C..A.....T.....C.T.....	:	53		
V3	:	-	..C..A.....T.....C.G.....	:	53		
V4	:	-	..C..A.....T.....C.G.....	:	53		
<i>D.valens</i>	:	-	..C..A.....T.....C.G.....	:	53		
S1	:	-		:	53		
<i>D.simplex</i>	:	-	A.....	:	53		
Pse1	:	-	A.....	:	53		
Pse2	:	-	A.....	:	53		
Pse3	:	-	A.....	:	53		
<i>D.pseudots</i>	:	-----	-----	:	-		
A1	:	-	G....A.....	:	53		
<i>D.adjunctu</i>	:	-	G....A.....	:	53		
		ttc catatt at ag caaga agagg aaaaa gaagc tttggatta t g					
		60	*	80	*	100	
Pon1	:	-	C.....T.....	:	106		
Pon2	:	-	C.....T.....	:	106		
Pon3	:	-	T.....	:	106		
<i>D.ponderos</i>	:	-	T.....	:	106		
R1	:	-	G.....C.....G..C.....	:	106		
R2	:	-	T.....C.....G..C.....	:	106		
R3	:	-	C.....G..C.....	:	106		
<i>D.rufipenn</i>	:	-	C.....G..C.....	:	106		
V1	:	.C.....-	C.....TC.....	:	106		
V2	:	.T.....-	C.....TC.....	:	106		
V3	:	.T.....-	C.....TC.....	:	106		
V4	:	.T.....-	C.....CC.....	:	106		
<i>D.valens</i>	:	.T.....-	C.....CC.....	:	106		
S1	:	-		:	106		
<i>D.simplex</i>	:	-	C.....G.....	:	106		
Pse1	:	-	T.....C.....A.....	:	106		
Pse2	:	-	T.....C.....A.....	:	106		
Pse3	:	-	T.....C.....A.....	:	106		
<i>D.pseudots</i>	:	-----	-----	:	-		
A1	:	.T.....-	C.....	:	106		
<i>D.adjunctu</i>	:	.T.....-	C.....	:	106		
		g ataa t tatgctataatagcaattgg ta tagg tttgtagtatg gc					

		*	120	*	140	*	160	
Pon1	:	..C.....						: 160
Pon2	:	..C.....						: 160
Pon3	:	..C.....						: 160
<i>D.ponderos</i>	:	..C.....						: 160
R1	:	..C.....C..G.....T.....G.....C..G.....C.....C						: 160
R2	:	..C.....C.....C.....T.....T.....C.....A.....C						: 160
R3	:	..C.....C.....C.....C.....G.....C.....C.....C.....C						: 160
<i>D.rufipenn</i>	:	..C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C						: 160
V1	:	C.....						: 160
V2	:	C.....						: 160
V3	:	C.....						: 160
V4	:	C.....						: 160
<i>D.valens</i>	:	C.....						: 160
S1	:	A.....C.....T.....						: 160
<i>D.simplex</i>	:	T.....A.....C.....G.....C..G..						: 160
Pse1	:	C.....						: 160
Pse2	:	C.....						: 160
Pse3	:	C.....						: 160
<i>D.pseudots</i>	:	-----						: -
A1	:	C.....G.....C.....T..T.....A						: 160
<i>D.adjunctu</i>	:	C.....T..T.....G..A						: 160
		ca ca atatt acagtagg atagatgt gatac cg gcctattttac tc						
		*	180	*	200	*		
Pon1	:	C.....A.....T...T						: 214
Pon2	:	C.....A.....T...T						: 214
Pon3	:	C.....A.....T...T						: 214
<i>D.ponderos</i>	:	C.....A.....T...T						: 214
R1	:	..C.....A.....G.....T..						: 214
R2	:	..C.....A.....G.....						: 214
R3	:	..C.....A.....G..G..C..						: 214
<i>D.rufipenn</i>	:	..C.....A.....G.....C..						: 214
V1	:	C..T.....G..C..						: 214
V2	:	A.....G..C..						: 214
V3	:	G.....G..C..						: 214
V4	:	C.....G.....G..C..						: 214
<i>D.valens</i>	:	G.....G..C..						: 214
S1	:	C.....A.....T...T						: 214
<i>D.simplex</i>	:	A.....T...T...						: 214
Pse1	:	GT..G..A						: 214
Pse2	:	GT..G..A						: 214
Pse3	:	GT..G..A						: 214
<i>D.pseudots</i>	:	-----,.....T...A						: 15
A1	:	C..T.....G....A						: 214
<i>D.adjunctu</i>	:	C..T.....C..G						: 214
		gc acaataattat gcagttcc ac ggaattaaaattTTTAG TG T GC						
		220	*	240	*	260	*	
Pon1	:	T.....T.....A.....C.....C.....						: 268
Pon2	:	T.....T.....A.....C.....C.....						: 268
Pon3	:	T.....T.....A.....C.....C.....						: 268
<i>D.ponderos</i>	:	T.....T.....A.....C.....C.....						: 268
R1	:	C.....T.....						: 268
R2	:	C.....T.....						: 268
R3	:	C.....T.....						: 268
<i>D.rufipenn</i>	:	C.....T.....						: 268
V1	:	G..C.....C.GGC.....A.....						: 268
V2	:	G..C.....C.GAC.....A.....						: 268
V3	:	G..C.....C.GAC.....A.....						: 268
V4	:	G..C.....C.GGC.....A.....						: 268
<i>D.valens</i>	:	G..C.....C.GAC.....A.....						: 268
S1	:	T.....G.....C..C.....						: 268
<i>D.simplex</i>	:	C.....G.....C..C.....C.....C.....						: 268
Pse1	:	T.....C.....T.....G.....						: 268
Pse2	:	T.....C.....T.....G.....						: 268
Pse3	:	T.....C.....T.....G.....						: 268
<i>D.pseudots</i>	:	T.....C.....T.....G.....						: 69
A1	:	C.....A.....C..A...T..A..G.....						: 268
<i>D.adjunctu</i>	:	G..C.....AC....C..C..A...T..A..G.....						: 268
		ACATA CATGG TC CAaAT A TAAC CC TC TCtct TG GctATTGGA						

		280	*	300	*	320	
Pon1	:	T.....		C.....			: 322
Pon2	:	T.....		C.....			: 322
Pon3	:	T.....		C.....			: 322
<i>D.ponderos</i>	:	T.....		C.....			: 322
R1	:	..C....C.....		..G..C.....C.....C...			: 322
R2	:	..C....C.....		..G..C.....C.....C...			: 322
R3	:	..C....C.....		..G..C.....C.....C...			: 322
<i>D.rufipenn</i>	:	..C....C.....		..G..C.....C.....C...			: 322
V1	:	T.....		A..C...			: 322
V2	:	T.....		A..C...			: 322
V3	:	..C.....T.....		A..C...			: 322
V4	:	..C.....T.....		A..C...			: 322
<i>D.valens</i>	:	..C.....T.....		A..C...			: 322
S1	:	G.....		A.....			: 322
<i>D.simplex</i>	:	G..G.....		A.....C			: 322
Pse1	:	G..G..TC.....		A..G.....			: 322
Pse2	:	G..G..TC.....		A..G.....			: 322
Pse3	:	G..G..TC.....		A..G.....			: 322
<i>D.pseudots</i>	:	G..G..TC.....		A..G.....			: 123
A1	:	G..C.....T..A.....C.....C					: 322
<i>D.adjunctu</i>	:	G..C.....G..G.....T..A.....C.....C					: 322
		TT ATTTTtCTtTTtACTaT GG GG tTaAC GG GTaATT TAGC AA TC					
		*	340	*	360	*	
Pon1	:	..T.....C..C.....C.....					: 376
Pon2	:	..T.....C..C.....C.....					: 376
Pon3	:	..T.....C..C.....C.....					: 376
<i>D.ponderos</i>	:	..T.....C..C.....C.....					: 376
R1	:	T....C..C.....C.....C.....C...					: 376
R2	:	T....C..C.....C.....C.....C...					: 376
R3	:	T....C..C.....C.....C.....C...					: 376
<i>D.rufipenn</i>	:	T....C..C.....C.....C.....C...					: 376
V1	:	T....C.....					: 376
V2	:	T....C.....					: 376
V3	:	T....C.....					: 376
V4	:	T....C.....					: 376
<i>D.valens</i>	:	T....C.....					: 376
S1	:	G....C.....					: 376
<i>D.simplex</i>	:	G....C.....					: 376
Pse1	:	C.....					: 376
Pse2	:	C.....					: 376
Pse3	:	C.....					: 376
<i>D.pseudots</i>	:	C.....					: 177
A1	:	..T.....T.....A.....T.....C.....C.....					: 376
<i>D.adjunctu</i>	:	..T.....T....C..A.....T....C.....C.....					: 376
		TC ATTGATATTAtt T CATGA AC TAtTATGTaGTaGC CATTt CatTAT					
		380	*	400	*	420	*
Pon1	:	G..G.....T					: 430
Pon2	:	G..G.....T					: 430
Pon3	:	G..G.....T					: 430
<i>D.ponderos</i>	:	G..G.....T					: 430
R1	:	..C.....G..G.....C.....C..C.....					: 430
R2	:	A.....GT.C..C.....					: 430
R3	:	..C.....G..G.....C.....T..C..C.....					: 430
<i>D.rufipenn</i>	:	C.....T..C..C.....					: 430
V1	:	..C.C.....G..G.....C..C.....CC.G.GG..G.....C.....					: 430
V2	:	..C.C.....G.....C..C.....CC.G.GG..G.....C.....A.					: 430
V3	:	..C.C.....G..G.....C..C.....CC.G.GG..G.....C.....T					: 430
V4	:	..C.C.....C..C.....CCGG.GG..G.....C.....T					: 430
<i>D.valens</i>	:	..C.C.....C..C.....CC.G.GG..G.....C.....T					: 430
S1	:	T..C.....					: 430
<i>D.simplex</i>	:	..C.....C.....T..T.....					: 430
Pse1	:	..T.....T..T.....					: 430
Pse2	:	..T.....T..T.....					: 430
Pse3	:	..T.....T..T.....					: 430
<i>D.pseudots</i>	:	..T.....T..T.....					: 231
A1	:	..C.....G.....T.....T.....					: 430
<i>D.adjunctu</i>	:	T.....T.....T.....T.....					: 430
		GT T TCTATaGG GCaGT TT GCTAT t G GG T aT CAATGATt					

		440	*	460	*	480	
Pon1	:	..C.....	A.....	CC.....	T	:	484
Pon2	:	..C.....	A.....	CC.....	T	:	484
Pon3	:	..C.....	A.....	CC.....	T	:	484
<i>D. ponderos</i>	:	..C.....	A.....	CC.....	T	:	484
R1	:		AC.....	G...C...G...C.....		:	484
R2	:		AC.....	G...C...G...C.....		:	484
R3	:		AC.....	G...C...G...C.....		:	484
<i>D. rufipenn</i>	:		AC.....	G...C...G...C.....		:	484
V1	:	C.....	AC.....	C.....C.....C.....		:	484
V2	:	C.....	AC.....	C.....C.....C.....		:	484
V3	:	C.....	GC.....	C.....G...C.....		:	484
V4	:	C...G...AC.....	C.....G...C.....			:	484
<i>D. valens</i>	:	C.....	GC.....	C.....G...C.....		:	484
S1	:			G...C.....		:	484
<i>D. simplex</i>	:	..A.....	T.....	G...C.....		:	484
Pse1	:			C.....		:	484
Pse2	:			C.....		:	484
Pse3	:			C.....		:	484
<i>D. pseudots</i>	:			C.....		:	285
A1	:	..A.....		C.....C.....		:	484
<i>D. adjunctu</i>	:	..A.....		CC.....C.....		:	484
		CC CT TTTacAGG	TAACttTAAa	AATAa TA tTAAaAaT	CAATTt Ta		
		*	500	*	520	*	
Pon1	:	G.A.....	T...C.....	T.....-...T...C	:		530
Pon2	:	G.A.....	T...C.....	T.....-...T...C	:		530
Pon3	:	G.A.....	TT...C.....	T.....-...T...C	:		530
<i>D. ponderos</i>	:	G.A.....	T...C.....	T.....-...T...C	:		530
R1	:	C.....	T...C...G.....	AA...-...T...CA	:		530
R2	:	C.....	T...C...T.....	AA...-...T...C	:		530
R3	:	C.....	T...C.....	AA...-...T...C	:		530
<i>D. rufipenn</i>	:	C.....	T...C.....	A...-...T...C	:		530
V1	:	..A.....		C.....-.....	:		530
V2	:	..A.....	T.....	A...-.....C	:		530
V3	:	..A.....		C.....-.....	:		530
V4	:	..A.....		C.....-.....	:		530
<i>D. valens</i>	:	..A.....		C.....-.....	:		530
S1	:		CC...C.....	T...CG.T...G...C	:		530
<i>D. simplex</i>	:	G.....G.....	CC.C...C.....	T...C...-.....C	:		530
Pse1	:	GT.....		T...T...G-.....	:		530
Pse2	:	GT.....		T...T...G-.....	:		530
Pse3	:	GT.....		T...T...G-.....	:		530
<i>D. pseudots</i>	:	GT.....		T...T...G-.....	:		331
A1	:	GTC.....	T.A.....	A...T...C...G-.....	:		530
<i>D. adjunctu</i>	:	GTC.....	T.A.....	C...A...T...C...G-.....	:		530
		ATATTt T GGaGT aA	TaAC TT TT CC cA	CA tT			

图 1 所测大小蠹样本的 COI 基因序列

Fig.1 COI gene sequence of *Dendroctonus* spp.

图中点(.)代表所有大小蠹在此处的碱基与下部所列的碱基相同;序列的变异以大写字母表示。

The dot denotes a match with the base below; The variations are shown as the capital letters.

2.2 大小蠹属昆虫的分子进化树

从数据库中下载红脂大小蠹、红翅大小蠹、中欧山松大小蠹、间大小蠹及落叶松大小蠹的相关序列(表 2),结合所扩增的 12 个样本进行系统进化树分析。结果(图 2)显示,整个进化树分为明显的 2 支,其中一支是间大小蠹,另一支由红脂大小蠹、红翅大小蠹、中欧山松大小蠹和落叶松大小蠹组成。而红脂大小蠹的所有样本又分为 2 个支系,支系 1 为 V1 和 V2,支系 2 为 V3、V4 以及数据库中下载的 4 个样本序列(Cai *et al.*,2008)。其中,V3 与爱达荷州和华盛顿州样品的亲缘关系较近,V4 与山西

忻州的样品最为接近,其次与美国南达科他州的亲缘关系近;V1 与 V2 的亲缘关系较近,为独立支系。

红翅大小蠹的 3 个样本与 Maroja *et al.* (2007) 的 5 个样本进行系统进化分析,其中,DQ165429 和 DQ165385 属于北美第一支系,DQ165409 和 DQ165439 属于落基山支系。由进化树(图 2)可以发现,所有的红翅大小蠹分为 2 个分支,R2 单独呈一分支,其他为第 2 分支。在第 2 分支中,R1 和 R3 与落基山支系亲缘关系较近,其次与 DQ165429 和 DQ165385 关系较近。红翅大小蠹 R1 样本与 DQ165409(哥伦比亚省)的虫样距离最近,由于 R1

是来自加拿大的虫样,可以认为,R1 虫样来自哥伦比亚省的进口木材;R3 样本与 DQ165429(犹他州)的样本距离较近,但由于 R3 是否来自美国境内尚不明确,只能推断 R3 可能是由犹他州或与犹他州亲缘关系较近的红翅大小蠹经木材进口而携带;样本 R2 与 DQ165385(阿拉斯加)较为接近,但总体看来成单独一支系。

表 2 数据库中下载的大小蠹相关信息
Table 2 COI gene sequence information of *Dendroctonus* spp. from GenBank

种类 Species	登录号 Accession no.	来源地 Source of the sample	种类 Species	登录号 Accession no.	来源地 Source of the sample
红脂大小蠹 <i>Dendroctonus valens</i>	EU404096	爱达荷州、华盛顿州 Idaho, Washington State, USA	中欧山松大小蠹	DQ866000	加利福尼亚 California, USA
	EU404097	南达科他州 South Dakota, USA	<i>Dendroctonus ponderosae</i>	DQ866013	爱达荷州 Idaho, USA
	EU404098	陕西 Shanxi		DQ866021	俄勒冈州 Oregon, USA
	EU404099	山西忻州 Shanxi xinzhou	间大小蠹	AY040286	古北区 Palearctic
红翅大小蠹 <i>Dendroctonus rufipennis</i>	DQ165385	阿拉斯加 Alaska, USA	<i>Dendroctonus adjunctus</i>	AF067992	新墨西哥州 New Mexico
	DQ165409	哥伦比亚省 Province of British Columbia, Canada		AF068001	墨西哥 Mexico
	DQ165429	纽芬兰 Newfoundland, Canada	落叶松大小蠹	AF067985	美国 America
	DQ165439	犹他州 Utah, USA	<i>Dendroctonus simplex</i>		

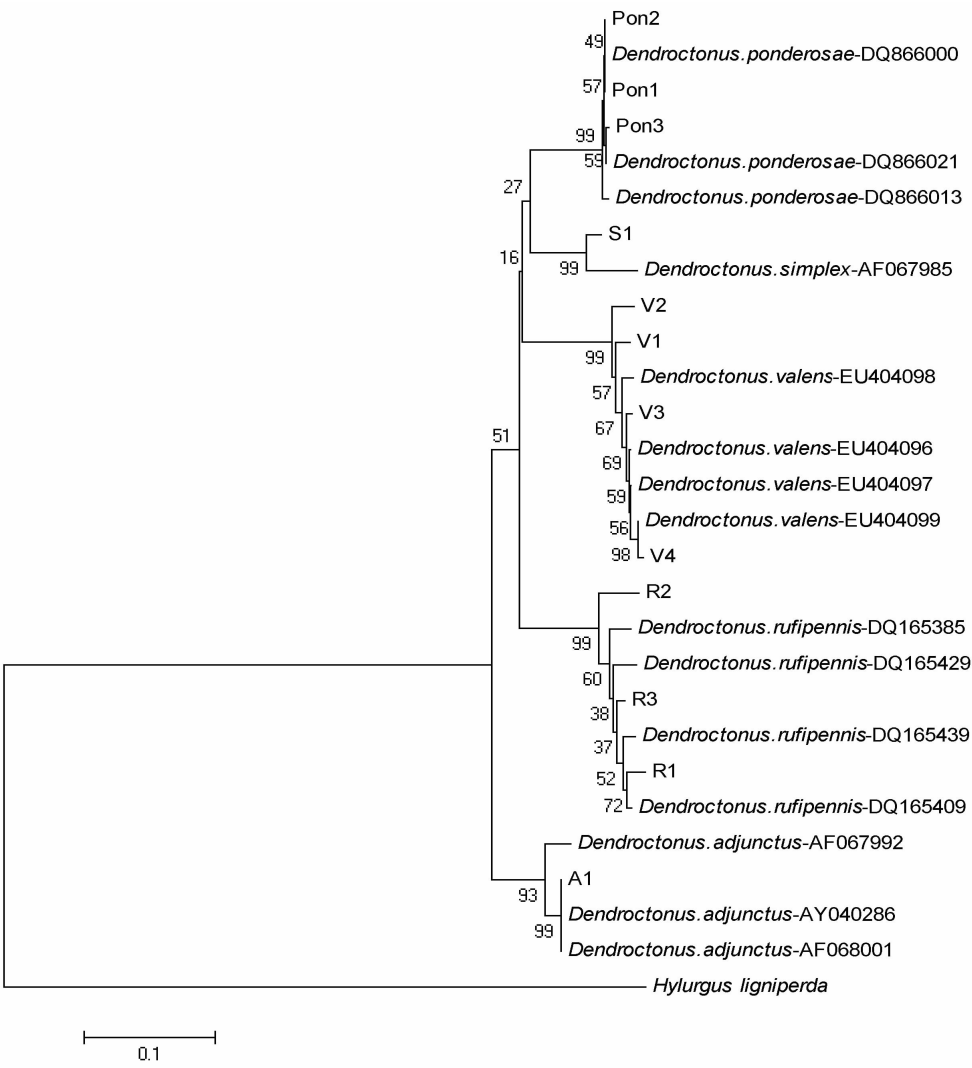


图 2 邻接法构建大小蠹属的系统进化树
Fig. 2 NJ tree of *Dendroctonus* spp. based on the COI gene sequence
以 *Hylurgus ligniperda* 的 COI 基因序列作为外群;分支置信度为 1000 次重复得到的自展值。
Hylurgus ligniperda used as the outgroup. Bootstrap values of 1000 replicates are indicated above the branches.

将中欧山松大小蠹的 3 个样本与 Mock *et al.* (2007) 所扩增的美国境内 5 个中欧山松大小蠹样本进行系统进化分析, 结果(图 2) 显示, 样本 Pon1 和 Pon2 的碱基序列完全一样, 和美国西部样本 DQ866000 (加利福尼亚) 的亲缘关系最为接近; Pon3 与 DQ866021 (俄勒冈州) 聚成一支, 由于 Pon3 的来源和年份不明确, 我们只能推断此虫样来源于北美西北海岸附近。

对间大小蠹和落叶松大小蠹样本以及数据库中下载的 2 种虫样的序列 (Sequeira & Farrell, 2001) 进行系统分析, 发现 A1 与 AY040286 (古北区) 和 AF068001 (墨西哥) 最为接近, S1 与 AF067985 (美国) 的序列完全相同。

3 讨论

本研究利用巢式 PCR 对红脂大小蠹、红翅大小蠹、中欧山松大小蠹、间大小蠹和落叶松大小蠹等 5 种大小蠹的 COI 基因进行测序, 结果显示, 巢式 PCR 对大小蠹属的 mtDNA 序列扩增效果理想, 同种大小蠹不同样本之间的序列存在一定差异。

Cognato *et al.* (2005) 通过 COI 基因序列比对认为, 红脂大小蠹由美国太平洋西北岸传入我国。基于 COI 及 RAPD 标记发现, 黄杉大小蠹 *D. pseudotsugae* Hopkins 的遗传变异与地理距离有显著的相关性, 即地理距离越远, 遗传分化越大。北部种群 (加拿大—美国) 和南部种群 (墨西哥) 可能是由同一个支系进化而来的亚种 (Ruiz *et al.*, 2009)。本研究所测定的红脂大小蠹共 4 个样本, 样本间均存在一定的差异, 有研究称, 昆虫取食不同的寄主会对其分子遗传结构产生较大的影响 (Hobson *et al.*, 1993), V1 与 V3 均采集自陕西油松, 因此, 其序列差异可以排除取食的影响。V4 与山西忻州种群的亲缘关系最近, 其次与美国南达科他州的亲缘关系近; V3 与爱达荷州和华盛顿州样品的亲缘关系较近, V2 和 V1 的关系较近, 但 V2 单独为一支系, V1 与 V3、V4 为一支系。这说明我国红脂大小蠹的起源地不同。由于 V2 来源地不详, 只有对我国与北美境内大量样本进行研究, 才能确定其是否来源于北美, 或是否已形成我国的特异性种群。

系统进化分析显示, 红翅大小蠹的 R1 与 R3 均属于落基山支系, 所以落基山支系侵入我国的风险性相对较高; R2 样本单独为一支系, 但与阿拉斯加样品较为接近, 未来需要对阿拉斯加及加拿大北部

的样本进行检测扩增。受地理种群分化的影响, 所测中欧山松大小蠹的样本均与美国西部的种群较为接近。来自美国的间大小蠹样本与古北区种群较为接近, 而阿拉斯加的落叶松大小蠹样本与美国的样本序列最为接近, 但由于落叶松大小蠹和间大小蠹的 COI 序列过少, 因此不能明确不同地理种群的间大小蠹与落叶松大小蠹样本的亲缘关系。

今后应增大检测样本量, 尤其需加强对北美种群 COI 基因的扩增, 建立完善的大小蠹属来源地分布情况, 得出入侵我国风险性较大的大小蠹种类, 从而有针对性地对这些地方的木材及木质包装进行重点排查检疫, 有效防止大小蠹属害虫的传入。

参考文献

- 安榆林. 2004. 光肩星天牛分子遗传多样性及 PCR 鉴定技术的研究. 南京: 南京林业大学.
- 刘勇. 2010. 新名录中齿小蠹属 (非中国种) 检疫鉴定技术研究. 江苏: 吴江出入境检验检疫局.
- 冉俊祥. 2001. 进口原木传带大小蠹 *Dendroctonus* spp. 风险分析. 检验检疫科学, 11(3): 27–30.
- 宋玉双, 杨安隆, 何嫩江. 2000. 森林有害生物红脂大小蠹的危险性分析. 森林病虫害通讯, 19(6): 34–37.
- 姚剑, 温劲松, 张龙娃, 李云飞, 陈雪娇, 余晓峰. 2010. 外来入侵种红脂大小蠹 COI 基因分化的研究. 昆虫知识, 47(5): 870–876.
- 郑斯竹, 安榆林, 徐梅, 杨晓军, 常虹, 嵇保中. 多年保存天牛科标本的 DNA 微量提取方法. 植物检疫, 26(3): 30–34.
- Cai Y W, Cheng X Y, Xu R M, Duan D H and Kirkendall L R. 2008. Genetic diversity and biogeography of red turpentine beetle *Dendroctonus valens* in its native and invasive regions. *Insect science*, 15: 291–301.
- Cognato A I, Sun J H, Anducho-Reyes M A and Owen D R. 2005. Genetic variation and origin of red turpentine beetle (*Dendroctonus valens* LeConte) introduced to the People's Republic of China. *Agricultural and Forest Entomology*, 7: 87–94.
- Folmer O, Black M B, Hoch W, Lutz R A and Vrijehock R C. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 294–299.
- Hobson K R, Wood D L, Cool L G, Peter R W, Ohtsuka T,

- Kubo I and Zavarin E. 1993. Chiral specificity in response by the bark beetle *Dendroctonus valens* to host kairomones. *Journal of Chemical Ecology*, 19: 1837 – 1846.
- Kelley S T and Farrell B D. 1998. Is specialization a dead end? The phylogeny of host use in *Dendroctonus* Bark Beetles (Scolytidae). *Evolution*, 52: 1731 – 1743.
- Kumar S, Koichiro T and Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5(2): 150 – 163.
- Maroja L S, Bogdanowicz S M, Wallin K F, Raffa K F and Harrison R G. 2007. Phylogeography of spruce beetles (*Dendroctonus rufipennis* Kirby) (Curculionidae: Scolytinae) in North America. *Molecular Ecology*, 16: 2560 – 2573.
- Mock K E, Bentz B J, Neill M O, Chong J O and Pfrender M E. 2007. Landscape-scale genetic variation in a forest outbreak species, the mountain pine beetle (*Dendroctonus ponderosae*). *Molecular Ecology*, 16: 553 – 568.
- Ruiz E A, Rinehart J E, Hayes J L and Zúñiga G. 2009. Effect of geographic isolation on genetic differentiation in *Dendroctonus pseudotsugae* (Coleoptera: Curculionidae). *Hereditas*, 146: 79 – 92.
- Schrey N M, Schrey A W and Heist E J. 2011. Genetic heterogeneity in a cyclical forest pest, the southern pine beetle, *Dendroctonus frontalis*, is differentiated into east and west groups in the southeastern United States. *Journal of Insect Science*, 11: 1 – 10.
- Sequeira A S and Farrell B. 2001. Evolutionary origins of gongwanan interactions: how old are *Araucaria* beetle herbivores? *Biological Journal of the Linnean Society*, 74: 459 – 474.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H and 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: 651 – 701.
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, Jeanmouquin F and Higgins D G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25: 4876 – 4882.

(责任编辑:彭露)

