

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2018.01.006

# 从进境杨木中首次截获条纹根瘤象 (鞘翅目:象甲科)

陈伟\*, 胡萌, 伦才智, 徐豪, 杨娟  
临沂出入境检验检疫局, 山东 临沂 276034

**摘要:**【目的】2016年9月临沂出入境检验检疫局从德国进境的杨木原木中检出活体象甲科昆虫。【方法】通过形态学观察与线粒体DNA细胞色素氧化酶(mtCOI)序列测定及系统进化分析,对该虫进行了物种鉴定。【结果】该虫的形态特征与条纹根瘤象相似;测序分析发现,其COI序列特征与GenBank中条纹根瘤象mtCOI序列相似性为100%;系统进化树表明,其与条纹根瘤象聚为一组。【结论】以上结果证实该虫为条纹根瘤象。这是我国首次从进境带皮杨木中截获该有害生物,需引起检验检疫部门的重视。

**关键词:** 条纹根瘤象; 苜蓿; 原木; 形态特征; COI序列; 系统发育

## First interception of *Sitona lineatus* (Coleoptera: Curculionidae) from imported poplar in China

CHEN Wei\*, HU Meng, LUN Caizhi, XU Hao, YANG Juan

Linyi Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Linyi, Shandong 276034, China

**Abstract:**【Aim】In September 2016, a specimen of an unidentified alive weevil was detected by the Linyi Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, China on poplar logs imported from Germany.【Method】The insect was identified using morphological characters, mitochondrial DNA cytochrome oxidase I gene (mtCOI) sequence and phylogenetic analysis.【Result】Identification using morphological characteristics indicated that this insect was *Sitona lineatus* L. (Coleoptera: Curculionidae). This was confirmed by the 100% homology rate of COI sequence of this insect and mtCOI sequence of *S. lineatus* in GenBank.【Conclusion】The results unequivocally confirmed that the intercepted insect was *S. lineatus*. This is the first intercepted specimen from imported poplar logs, indicating the possibility that the pest can reach China; attention needs to be paid by inspection and quarantine departments to its possible presence.

**Key words:** *Sitona lineatus*; *Medicago sativa*; log; morphological characteristics; COI sequence; phylogenetic analysis

条纹根瘤象 *Sitona lineatus* L., 又称豌豆叶象甲, 属鞘翅目 Coleoptera 象甲科 Curculionidae 根瘤象属 *Sitona*。该虫主要分布于欧洲和北美洲 (Olfert *et al.*, 2012; Vankosky *et al.*, 2009), 在我国新疆的阿勒泰和伊犁 (刘芳政等, 2000) 及甘肃的陇东黄土高原 (王佛生等, 2011) 和景泰 (周军和贺春贵, 2005) 有分布记录。寄主主要为豆科植物, 包括紫花苜蓿、白花苜蓿、野豌豆、田豌豆、宽豌豆、驴豆、蚕豆、扁豆、羽扇豆等 (Petruha, 1965), 其中对苜蓿的危害十分显著。该虫成虫可咬食苜蓿幼苗的叶子和生长点, 使植株受到破坏甚至死亡; 幼虫可蛀

食根和根瘤, 减少氮在根和土壤中的含量, 降低土壤肥力 (Cárcamo *et al.*, 2015; Corre-Hellou & Crozat, 2005), 同时, 根和根瘤被害容易使病原微生物入侵, 进一步引起根部腐烂。该虫一年发生1代, 常以成虫形态在多年生豆科植物下或土表枯枝落叶下越冬 (王登元和于江南, 2010)。

2016年9月, 临沂出入境检验检疫局对来自德国的带皮杨木原木进行检疫时, 截获象甲科昆虫。借助显微镜观察其形态特征, 并使用分子生物学方法对其进行鉴定, 以明确该虫种类, 为其防控提供依据。

收稿日期 (Received): 2017-09-23 接受日期 (Accepted): 2017-11-09

基金项目: 山东出入境检验检疫局科研计划项目 (SK201608)

作者简介: 陈伟, 女, 硕士。研究方向: 植物检疫

\* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: 378695831@qq.com

## 1 材料与方法

### 1.1 样品来源及形态学鉴定

象甲样品从德国进境带皮杨木原木中截获,经临沂出入境检验检疫局植物检疫实验室人员进行形态学鉴定并由中国检验检疫科学研究院昆虫鉴定专家进行复核后,使用蔡司 Discovery V20 体式显微镜对其拍照,并放入 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

### 1.2 DNA 提取

取样品一侧后腿,用 ddH<sub>2</sub>O 冲洗干净后放入 1.5 mL 离心管中,取 200  $\mu\text{L}$  chelex100 上清液(用前摇匀)加至离心管中,56  $^{\circ}\text{C}$  水浴 4 h 后,取出震荡 1 min,置于 100  $^{\circ}\text{C}$  水浴 8 min,取出震荡 1 min,13000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 3 min(欧阳刚等,2009),并置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

### 1.3 PCR 扩增和电泳

PCR 扩增 mtDNA COI 部分序列,扩增引物为通用引物 LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') 和 HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3')(Folmer *et al.*, 1994),由北京擎科新业生物技术有限公司合成。反应体系:擎科金牌 Mix 22  $\mu\text{L}$ ,上、下游引物各 0.5  $\mu\text{L}$ ,DNA 模板 2  $\mu\text{L}$ 。扩增反应条件:预变性 94  $^{\circ}\text{C}$  2 min,变性 94  $^{\circ}\text{C}$  1 min,退火 53  $^{\circ}\text{C}$  45 s,延伸 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min,运行 35 个循环后,72  $^{\circ}\text{C}$  再延伸 10 min;4  $^{\circ}\text{C}$  保温。取 6  $\mu\text{L}$  PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检验,记录结果。PCR 产物测序由上海生工生物工程技术有限公司完成。

### 1.4 序列比对及系统进化树构建

对于测序结果,首先根据测序峰值进行人工校对,切除两端不可信区域,5'端和 3'端各切除 40 和 60 bp 后,将测序结果提交至 NCBI 进行比对。选取菜豆象 *Acanthoscelides obtectus* (NC035677) 为外群,用 MEGA5.05 软件将测序结果及 GenBank 中获得的序列进行分析,并辅以人工校对,计算序列间遗传距离;采用 Kimura 2-paramter 距离矩阵,以邻接法构建系统树,系统树各分支的置信度(Bootstrap)均进行 1000 次的重复检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 形态学鉴定

显微观察可以看出,截获昆虫成虫体长 3.2~5.3 mm,宽 1.0~1.5 mm,黑色或棕色。身体覆盖灰色鳞片和短刚毛,前胸背板前缘两侧无长纤毛(图 1A);喙较粗壮,方形,短于前胸背板,端部向两侧扩展;眼大,微凸,侧生;额宽于喙,额与喙不分离,较平坦,有细而深的中沟;上颚没有颞疤;触角红色,膝状,触角窝侧背缘缘基尖隆,触角沟强烈弯向腹面,当触角收回靠近头部时,触角的柄节常指向眼下方;前胸最宽处位于身体中部;鞘翅上有交替排列的长刚毛连接成的条状纹路,头和前胸背部也有分布且与鞘翅相连接;前足基节相连或接近,有窄槽位于前胸背板腹面;股节黑色,胫节和跗节红色;爪离生,爪具附爪,第三跗节呈明显二叶状(图 1B)。

根据文献记载(Bright, 1994; Bright & Bouchard, 2008),截获昆虫的形态特征与条纹根瘤象相似。



图 1 2016 年 9 月在进口杨木中截获的条纹根瘤象形态图

Fig.1 A close-up photograph of the morphological characteristics of *S. lineatus* intercepted at imported poplar logs on September 2016

A: 背面观; B: 腹面观。

A: Dorsal view; B: Ventral view.

### 2.2 基于 mtCOI 的遗传距离与系统发育分析

样品经 PCR 扩增、测序,得到 1 条大小为 698 bp 的序列。Blast 比对结果表明,与目的片段相似度最

高的 7 个物种分别为条纹根瘤象 *Sitona lineatus*、细纹根瘤象 *S. lineellus*、*S. suturalis*、斑翅根瘤象 *S. macularius*、驴豆根瘤象 *S. callosus*、*S. languidus*、*S.*

lepidus, 其中与 GenBank 中登录号 KM444588 的条纹根瘤象 mtCOI 序列相似性达 100% (表 1)。此外, 本实验样品与条纹根瘤象的遗传距离均 < 1%。

从系统进化树(图 2)也可以看出, 本实验昆虫样品与条纹根瘤象(KM444588)的序列明显聚为一支, 置信度高达 99%, 且与外群差异明显。

表 1 GenBank 中 7 种高相似度种类与样品信息表  
Table 1 Information of 7 high similarity species and samples in GenBank

物种 Species	来源地 Origin	GenBank 登录号 Accession number	相似度 Similarity /%	物种 Species	来源地 Origin	GenBank 登录号 Accession number	相似度 Similarity /%
条纹根瘤象 <i>Sitona lineatus</i>	德国 Germany	KM444588	100	条纹根瘤象 <i>Sitona lineatus</i>	德国 Germany	KM441646	99
条纹根瘤象 <i>Sitona lineatus</i>	加拿大 Canada	KM846028	100	条纹根瘤象 <i>Sitona lineatus</i>	德国 Germany	KM440183	99
条纹根瘤象 <i>Sitona lineatus</i>	德国 Germany	KM445983	100	细纹根瘤象 <i>Sitona lineellus</i>	加拿大 Canada	KM843822	88
条纹根瘤象 <i>Sitona lineatus</i>	德国 Germany	KM449532	99	<i>Sitona suturalis</i>	德国 Germany	KM443011	87
条纹根瘤象 <i>Sitona lineatus</i>	德国 Germany	KM446813	99	斑翅根瘤象 <i>Sitona macularius</i>	德国 Germany	KM445607	87
条纹根瘤象 <i>Sitona lineatus</i>	德国 Germany	KM443470	99	驴豆根瘤象 <i>Sitona callosus</i>	中国 China	MF594624	86
条纹根瘤象 <i>Sitona lineatus</i>	德国 Germany	KM445669	99	<i>Sitona languidus</i>	德国 Germany	KM443419	86
条纹根瘤象 <i>Sitona lineatus</i>	德国 Germany	KM442371	99	<i>Sitona lepidus</i>	芬兰 Finland	KJ965409	85

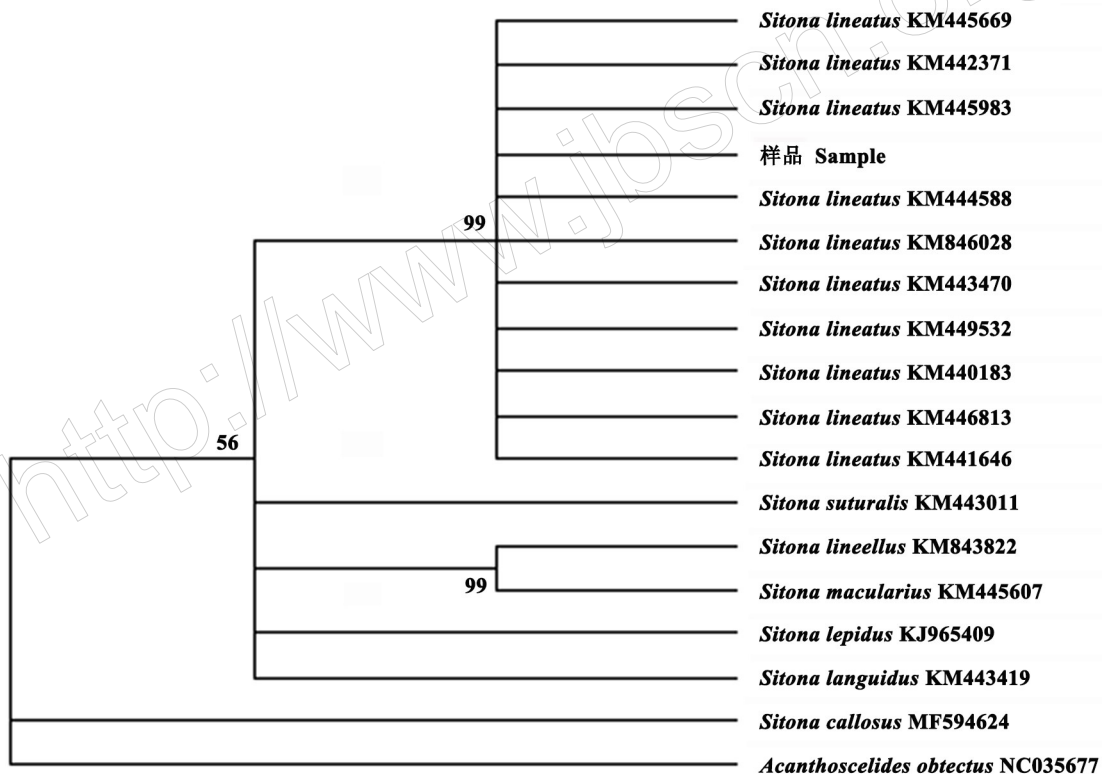


图 2 基于 COI 序列构建的系统进化树

Fig.2 Phylogenetic tree based on COI sequence

结合形态学特征和分子水平的分析结果, 可将截获的象甲科昆虫鉴定为条纹根瘤象。

### 3 讨论

随着经济全球化进程的加快, 我国进境原木及木质包装的数量激增。近几年, 从原木及木质包装中检出的有害生物种类越来越多, 象甲科昆虫就是其中重要的一类。目前, 对进境象甲科昆虫的鉴定主要以形态特征观察为主; 但由于象甲科昆虫种类

繁多, 且国外种的鉴定资料相对缺乏, 加之口岸检疫中常截获到昆虫早期虫态(卵、幼虫和蛹)或不完整虫体, 其形态鉴定工作仍存在较大困难。随着分子生物学技术的发展, 利用特征片段基因对物种进行鉴定已获得快速发展, 尤其以昆虫 mtCOI 为分子标记的方法得到广泛应用(段晓东等, 2011)。使用分子手段进行物种鉴定具有快速、高效, 不受物种形态、发育期等限制的优点; 但单纯使用分子手段

进行分类鉴定存在样品久置易降解而导致扩增失败以及分子数据库不完善等问题。研究表明,利用 *col1* 基因作条形码进行昆虫物种鉴定的准确率通常可达到 90% 以上,对某些种类甚至可达到 100%,但对于一些近似种的鉴定仍存在一定的风险(Guo *et al.*, 2014)。因此,利用标准条形码进行物种鉴定时应考虑其存在的风险性,可选用 2 种或 2 种以上的基因片段结合验证,或与形态学方法相结合,以提高鉴定的准确性。本研究采用形态学与分子生物学相结合的方法将截获的象甲科昆虫鉴定为条纹根瘤象,弥补了条纹根瘤象传统形态鉴定的不足,为其他象甲科昆虫的鉴定提供了参考,对象甲科昆虫的检疫鉴定工作具有重要意义,对口岸检验检疫部门进行快速准确的物种鉴定具有很大的帮助。

2014 年,天津出入境检验检疫局曾从美国进口的天然圣诞树上截获豌豆叶象甲。此次为我国首次从进境带皮杨木中截获该有害生物。条纹根瘤象可以随树木或带皮原木传入我国,其传播途径需要引起检验检疫部门的关注。

条纹根瘤象虽未被列入我国检疫性名录,但其对畜牧业发展具有很大的潜在危害性。如该虫在加拿大的草原和牧场发生了严重危害,且危害呈现持续扩张的态势(Olfert *et al.*, 2012)。对于条纹根瘤象的防治,一方面需要投入大量的杀虫剂以减少其成虫和幼虫对苜蓿植株的危害,另一方面需加大氮肥的投入量以补偿其幼虫危害根瘤所造成的土壤肥力的降低。在一些受害严重的苜蓿草场,很多种植者因这 2 项费用的投入成本过高而不得不放弃原有的苜蓿种植业。我国现有的苜蓿草场的分布地气候条件与欧洲和北美洲类似(刘艳俊等, 2017),条纹根瘤象一旦传入很容易定殖和扩散。因此,对其加强检疫对保护我国苜蓿产业的健康发展具有非常重要的意义。

### 参考文献

段晓东, 马丽娟, 姚正培, 曹骞, 冷春丽, 马德英, 2011. 新疆地区烟粉虱类群 mtDNA COI 基因序列分析. *生物安全学报*, 20(1): 50-55.

刘芳政, 赵莉, 张茂新, 玉山江, 2000. 新疆天然草地昆虫名录(二). *新疆农业大学学报*, 23(1): 88-94.

刘艳俊, 李慧萍, 吴福中, 付海滨, 奚国华, 毛本前, 2017. 山西口岸全国首次截获危险性蚱蚱并蛴蚱. *生物安全学报*, 26(2): 134-138.

欧阳刚, 胡文娟, 姚品芳, 王红, 陈思礼, 王朝元, 李劲, 2009. PCR-RFLP 中 Chelex-100 制备 DNA 模板的方法建立及其条件优化. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 28(1): 42-45.

王佛生, 邓芸, 霍转芳, 2011. 陇东黄土高原苜蓿田昆虫群落的组成与结构分析. *草业科学*, 28(12): 2195-2199.

王登元, 于江南, 2010. 新疆农业昆虫志. 乌鲁木齐: 新疆科学技术出版社.

周军, 贺春贵, 2005. 景泰第一茬苜蓿昆虫群落及数量动态. *草原与草坪*, 112(5): 69-71.

BRIGHT D E, 1994. Revision of the genus *Sitona* (Coleoptera: Curculionidae) of North America. *Annals of the Entomological Society of America*, 87(3): 277-306.

BRIGHT D E, BOUCHARD P, 2008. Coleoptera, Curculionidae, Entiminae // AEPOD. *The Insects and Arachnids of Canada*. Ottawa, Canada: NRC Research Press: 327.

CÁRCAMO H A, HERLE C E, LUPWAYI N Z, 2015. *Sitona lineatus* (Coleoptera: Curculionidae) larval feeding on *Pisum sativum* L. affects soil and plant nitrogen. *Journal of Insect Science*, 15(1): 74.

CORRE-HELLOU G, CROZAT Y, 2005. N<sub>2</sub> fixation and N supply in organic pea (*Pisum sativum* L.) cropping systems as affected by weeds and pea weevil (*Sitona lineatus* L.). *European Journal of Agronomy*, 22(4): 449-458.

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.

GUO Y D, ZHA L, YAN W T, LI P, CAI J F, WU L X, 2014. Identification of forensically important sarcophagid flies (Diptera: Sarcophagidae) in China based on COI and period gene. *International Journal of Legal Medicine*, 128(1): 221-228.

OLFERT O, WEISS R M, CÁRCAMO H A, MEERS S, 2012. The influence of abiotic factors on an invasive pest of pulse crops, *Sitona lineatus* (L.) (Coleoptera: Curculionidae), in North America. *Psyche: A Journal of Entomology*. DOI: 10.1155/2012/746342.

PETRUHA O I, 1965. Weevils of the genus *Sitona* Germ. (Curculionidae, Coleoptera) in USSR fauna that damage leguminous plants. PhD thesis. Kiev: National Agrarian University.

VANKOSKY M, DOSDALL L M, CÁRCAMO H A, 2009. Distribution, biology and integrated management of the pea leaf weevil, *Sitona lineatus* L. (Coleoptera: Curculionidae), with an analysis of research needs. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 4(7): 1-18.