

# 蚕豆象的线粒体基因组研究及系统发育分析

林兴雨, 宋南\*

河南农业大学植物保护学院, 河南 郑州 450046

**摘要:**【目的】蚕豆象是农业上一种重要害虫,本文测序、分析了蚕豆象的线粒体全基因组,以期为更好地理解茎甲亚科分支类群、豆象亚科和蚕豆象的系统发育提供线粒体基因组数据。【方法】在系统发育分析中,内群取样包含茎甲亚科分支类群的 22 种昆虫,外群选择 2 个肖叶甲亚科(*Basilepta fulvipes* 和 *Basilepta melanopus*) 昆虫,分别利用最大似然法和贝叶斯法重建茎甲亚科分支类群的系统发育关系。【结果】蚕豆象的线粒体基因组全长为 16586 bp (GenBank 序列号: OP650255),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。所有转运 RNA 基因中,除 *trnS1* 因缺少二氢尿嘧啶(DHU)臂而形成简单的环,无法构成稳定的三叶草结构外,其余转运 RNA 基因均能形成典型的三叶草结构。此外,*trnS1* 的反密码子不是常见的 GCU,而是 UCU。【结论】本研究首次获得了蚕豆象的线粒体基因组全序列。2 种不同的系统发育分析方法构建的系统发育关系显示:豆象亚科、茎甲亚科、水叶甲亚科和负泥虫亚科为单系群;豆象亚科与水叶甲亚科+负泥虫亚科为姐妹群;蚕豆象与四纹豆象为姐妹群。

**关键词:**鞘翅目;豆象亚科;蚕豆象;线粒体基因组;系统发育



开放科学标识码  
(OSID 码)

## The mitochondrial genome and phylogenetic analysis of *Bruchus rufimanus* (Boheman, 1833)

LIN Xingyu, SONG Nan\*

College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450046, China

**Abstract:**【Aim】The *Bruchus rufimanus* is an important agricultural insect pest. In this study, we sequenced and analyzed the mitochondrial genome of *B. rufimanus*, and it will contribute to increasing our knowledge of the mitochondrial genome and the phylogeny of "Sagrinae" clade group, Bruchinae and *B. rufimanus*.【Method】In phylogenetic analyses, we selected 22 exemplars of "Sagrinae" clade group (Bruchinae, Sagrinae, Donaciinae and Criocerinae) as ingroups. Two species of Eumolpinae (*Basilepta fulvipes* and *Basilepta melanopus*) were used as outgroups. The phylogenetic analyses were conducted using maximum likelihood and Bayesian inference methods.【Result】The mitochondrial genome of *B. rufimanus* is a circular molecule of 16586 bp in length (GenBank accession No. OP650255), which contains 13 protein-coding genes, two ribosomal RNA genes, 22 transfer RNA genes and a non-coding control region. All tRNA genes can be folded into typical cloverleaf structure, with the exception of the *trnS1*, which lacks the DHU arm. Furthermore, the anticodon of *trnS1* gene is not the common GCU, but rather the UCU.【Conclusion】This is the first report of a complete mitochondrial genome of *B. rufimanus*. Both phylogenetic inference methods produced a similar tree topological structure: the subfamily Bruchinae, Sagrinae, Donaciinae and Criocerinae were recovered the monophyletic groups. The subfamily Bruchinae were cluster to (Donaciinae+Criocerinae) a clade. The *B. rufimanus* was sister to *Callosobruchus maculatus*.

**Key words:** Coleoptera; Bruchinae; *Bruchus rufimanus*; mitochondrial genome; phylogeny

蚕豆象 *Bruchus rufimanus* Boheman 属鞘翅目 Coleoptera 叶甲科 Chrysomelidae 豆象亚科 Bruchinae, 是农业上的一种重要害虫,在全世界均有分布(来有鹏, 2019; 王昶等, 2018)。蚕豆象在我国一

年发生一代,卵为浅黄色椭圆形,幼虫体色为乳白色,有 4 个龄期,整个幼虫龄期平均约为 90 d,蛹一般为浅黄色椭圆形,成虫具有椭圆形黑色的体背,主要以蚕豆 *Vicia faba* Linn. 为食,严重时可降低蚕

收稿日期(Received): 2023-02-08 接受日期(Accepted): 2023-03-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(U1904104)

作者简介: 林兴雨, 男, 硕士研究生。研究方向: 基于基因组的昆虫系统发生研究。E-mail: xingyulin666666@163.com

\* 通信作者(Author for correspondence), 宋南, E-mail: songnan@henau.edu.cn

豆产量 30% 左右,是蚕豆生长发育期危害最严重的一种害虫(丁国卫等,2006;董亮,2011;徐淑华,2012; Biddle & Catlin,2007; Tran *et al.*,1993)。目前,对蚕豆象的研究主要集中在生物学、化学生态学和害虫防治等方面(王昶等,2018; Gailiset *al.*,2022; Mendesil *et al.*,2022; Segers *et al.*,2021),暂未发现蚕豆象的线粒体基因组的分子系统学研究。

近年来,随着高通量测序技术的快速发展,越来越多的昆虫线粒体基因组被公布。线粒体基因组作为一种分子遗传标记,具有基因组组织结构相对保守、进化速率快和母系遗传等优点,已经被广泛应用于鞘翅目昆虫的系统发育研究(林兴雨等,2022; Gillett *et al.*,2014; Song *et al.*,2018)。截至 2023 年 2 月,GenBank 上已经释放了超过 400 条叶甲科完整或部分的线粒体基因组数据。

叶甲科由 3 个主要的亚科类群组成:茎甲亚科 Sagrinae 分支类群(豆象亚科 Bruchinae、茎甲亚科 Sagrinae、水叶甲亚科 Donaciinae 和负泥虫亚科 Criocerinae)、肖叶甲亚科 Eumolpinae 分支类群(Spilopyrinae、肖叶甲亚科 Eumolpinae、隐头叶甲亚科 Cryptocephalinae 和 龟甲亚科 Cassidinae)和叶甲亚科 Chrysomelinae 分支类群(叶甲亚科 Chrysomelinae 和 萤叶甲亚科 Galerucinae)(Gómez-Zurita *et al.*,2008)。然而,叶甲科 3 个主要的亚科类群之一的茎甲亚科 Sagrinae 分支类群仅有 21 条线粒体基因组数据被释放。

本研究利用高通量测序技术首次获得了完整的蚕豆象的线粒体基因组数据,对其线粒体基因组组织结构进行了注释,对密码子的使用频率、核苷酸的含量组成、转运 RNA 的二级结构等线粒体基因组特点分别进行了详细分析和预测,以期为更好地理解茎甲亚科分支类群、豆象亚科和蚕豆象的系统发育提供基因组数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本采集与 DNA 提取

试验所用的蚕豆象成虫标本于 2020 年 10 月采集于河南省郑州市(34°80'N, 113°66'E)。将采集到的蚕豆象成虫标本浸泡在 95%乙醇中,置于河南农业大学植物保护学院标本馆-80 °C 超低温冰箱中,用于 DNA 提取。根据天根生化科技(北京)有限公司的动物基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取蚕豆象成虫胸部肌肉的总 DNA。使用 NanoDrop

2000 分光光度计和 1.5%的琼脂糖凝胶电泳分别检测样本总 DNA 的浓度及质量。

### 1.2 高通量测序与线粒体基因组组装

将检测质量合格以及浓度大于 20 ng · μL<sup>-1</sup>的 DNA 送往北京诺禾致源科技股份有限公司构建 350 bp 的小片段文库,并进行高通量测序,使用 Illumina HiSeq 2500 测序平台对所构建的小片段测序文库进行双末端(2×150 bp PE)测序。最后,将下机的原始数据去除接头,进行质量控制,过滤、删除低质量的序列,获得 clean reads。利用 GetOrganelle v1.7.5.2 软件(Jin *et al.*,2020)进行线粒体基因组的组装以及拼接,从而得到完整的线粒体基因组数据。

### 1.3 线粒体基因组的注释和分析

采用组装得到的蚕豆象的线粒体全基因组数据在 MITOS 在线网站(Bernt *et al.*,2013)上进行初步的功能注释,参数设置 genetic code:05-invertebrate;reference:RefSeq 89 Metazoa,其余均按照 MITOS 默认参数进行设置。通过 MITOS 预测后得到 22 个转运 RNA 基因的二级结构,对近缘种的线粒体基因组的序列比对和验证,手动矫正线粒体基因组的 13 个蛋白质编码基因、*rmlL* 和 *rmlS* 核糖体基因和 22 个转运 RNA 的基因边界。将注释正确的线粒体全基因组序列上传至 GenBank 获得登陆号为 OP650255。利用 MEGA 11.0 软件(Tamura *et al.*,2021)分析和计算蚕豆象线粒体基因组全部的蛋白质编码基因的碱基组成以及密码子的使用频率情况。利用  $AT-skew = (A-T)/(A+T)$  和  $GC-skew = (G-C)/(G+C)$  公式分别计算蚕豆象线粒体基因组的 AT 偏倚和 GC 偏倚(Perna & Kocher,1995)。

### 1.4 多序列比对

利用 MAFFT version 7 软件对蚕豆象的蛋白质编码基因的核苷酸和氨基酸序列分别进行比对(Katoh & Standley,2013)。使用 trimAl v1.4 对序列中模糊比对的片段进行修剪、删除和对齐(Capella-Gutiérrez *et al.*,2009)。利用 FASconCAT-G\_v1.04 进行串联线粒体基因组序列得到数据矩阵(Kück & Longo,2014)。用于构建系统发育分析的数据矩阵包括 13 个蛋白质编码基因的核苷酸序列(13 PCGnt)构建的数据矩阵和 13 个蛋白质编码基因的氨基酸序列(13 PCGaa)构建的数据矩阵。

### 1.5 系统发育分析

利用最大似然法 (maximum likelihood) 和贝叶斯法 (Bayesian inference) 重建茎甲亚科分支类群的系统发育树。利用 IQ-TREE 2.0.6 (Nguyen *et al.*, 2015) 进行最大似然法系统发育分析, 根据贝叶斯信息法则 (Bayesian Information Criterion, BIC) 通过软件自动筛选得到最适建树模型为 GTR+F+I+G4 模型, 系统发育树的节点支持率通过自举检验置信度进行评估 (参数设置为 -bb:10000, -nm:10000, -alrt:10000)。使用 MrBayes v3.2 进行贝叶斯法系统发育分析 (Ronquist *et al.*, 2012): 使用 4 条蒙特卡罗马尔柯夫链 (Markov chain Monte Carlo, MCMC) 同时运行  $2 \times 10^6$  代, 每运行结束 1000 代进行一次抽样, 删除 25% 的老化树, 获得多数一致树。

## 2 结果与分析

### 2.1 线粒体基因组分析

利用 OGDRAW Version 1.1 软件 (Greiner *et al.*, 2019) 获得蚕豆象的线粒体全基因组结构图 (图 1)。蚕豆象的线粒体基因序列全长 16586 bp, 其中, A+T 含量为 76.95%, G+C 含量为 23.05%。该线粒体全基因组包含 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 1 个非编码控制区 (表 1)。

在蚕豆象的线粒体基因组中, L 链 (light strand) 共编码 14 个线粒体基因, 分别包含 4 个蛋白质编码基因、8 个转运 RNA 基因以及 2 个核糖体 RNA 基因; H 链 (heavy strand) 共编码 23 个线粒体

基因, 分别包括 9 个蛋白质编码基因和 14 个转运 RNA 基因。非编码控制区位于 *rrnS* 和 *trnI* 之间, 长度为 942 bp, 其 A+T 和 G+C 含量分别为 82.06% 和 17.94%。蚕豆象的正、负链的蛋白质编码基因、负链的核糖体 RNA 基因、正、负链的转运 RNA 基因以及整个线粒体基因组的 A+T 含量丰富, 为 73.8% ~ 80.8%。其中, 位于正链的 9 个蛋白质编码基因的 A+T 含量最低为 73.8%, 位于负链的 2 个核糖体 RNA 基因的 A+T 含量最高为 80.8%。AT 偏倚和 GC 偏倚分别为  $-0.230 \sim 0.036$  和  $-0.187 \sim 0.343$  (表 2)。

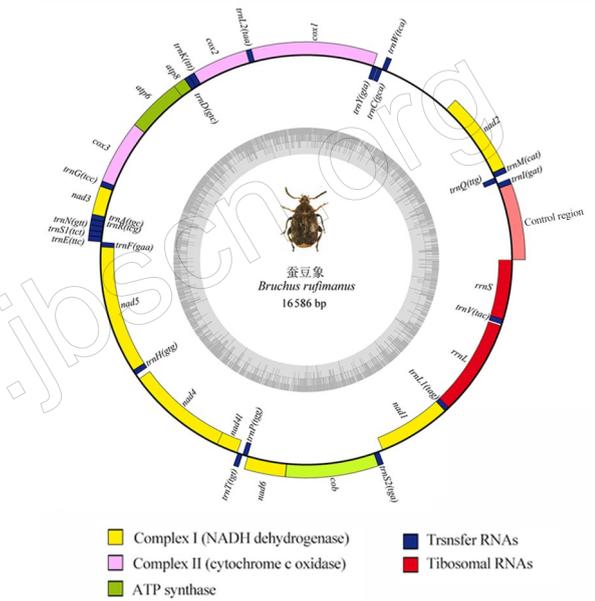


图 1 蚕豆象线粒体基因组结构  
Fig.1 Structure of *B. rufimanus* mitochondrial genome

表 1 蚕豆象线粒体基因组注释  
Table 1 Annotation of the mitochondrial genome of *B. rufimanus*

基因 Gene	长度 Gene length/bp	起始位置 Start position/bp	终止位置 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>	66	943	1008			H
<i>trnQ</i>	69	1090	1022			L
<i>trnM</i>	69	1090	1158			H
<i>nad2</i>	1014	1159	2172	ATT	TAA	H
<i>trnW</i>	66	3089	3154			H
<i>trnC</i>	63	3209	3147			L
<i>trnY</i>	66	3280	3215			L
<i>cox1</i>	1548	3273	4820	ATC	TAA	H
<i>trnL2</i>	65	4816	4880			H
<i>cox2</i>	685	4884	5568	ATA	T	H
<i>trnK</i>	70	5569	5638			H
<i>trnD</i>	66	5638	5703			H
<i>atp8</i>	156	5704	5859	ATT	TAA	H
<i>atp6</i>	675	5853	6527	ATG	TAA	H

续表 1

基因 Gene	长度 Gene length/bp	起始位置 Start position/bp	终止位置 Stop position/bp	起始密码子 Start codon	终止密码子 Stop codon	编码链 Coding strand
<i>cox3</i>	789	6527	7315	ATG	TAA	H
<i>trnG</i>	66	7316	7381			H
<i>nad3</i>	354	7382	7735	ATA	TAG	H
<i>trnA</i>	65	7734	7798			H
<i>trnR</i>	65	7800	7864			H
<i>trnN</i>	68	7864	7931			H
<i>trnS1</i>	67	7932	7998			H
<i>trnE</i>	65	7999	8063			H
<i>trnF</i>	67	8128	8062			L
<i>nad5</i>	1713	9797	8085	ATT	TAA	L
<i>trnH</i>	69	9866	9798			L
<i>nad4</i>	1327	11258	9932	ATG	T	L
<i>nad4l</i>	282	11533	11252	ATG	TAA	L
<i>trnT</i>	65	11544	11608			H
<i>trnP</i>	66	11674	11609			L
<i>nad6</i>	507	11680	12186	ATT	TAA	H
<i>cob</i>	1140	12186	13325	ATG	TAA	H
<i>trnS2</i>	68	13325	13392			H
<i>nad1</i>	951	14394	13444	TTG	TAG	L
<i>trnL1</i>	65	14460	14396			L
<i>rrnL</i>	1284	15721	14438			L
<i>trnV</i>	69	15809	15741			L
<i>rrnS</i>	778	16586	15809			L
Control region	942	1	942			Non-coding sequence

H:重链;L:轻链。

H: Heavy strand; L: Light strand.

表 2 蚕豆象的核苷酸组成和偏倚

Table 2 Nucleotide composition and skewness of the *B. rufimanus* mitochondrial genome.

特征 Feature	长度 Size/bp	A+T 含量 Content of A+T/%	AT 偏倚 AT-skew	GC 偏倚 GC-skew
PCGs-H	6867	73.8	-0.111	-0.144
PCGs-L	4272	78.4	-0.230	0.275
rRNAs-L	2062	80.8	-0.073	0.343
tRNAs-H	931	78.2	0.036	0.005
tRNAs-L	534	74.4	0.008	0.241
全基因组 Whole genome	16586	76.9	0.033	-0.187

PCGs:蛋白质编码基因;rRNAs:核糖体 RNA;tRNAs:转运 RNA;H:重链;L:轻链。

PCGs: Protein-coding genes; rRNAs: Ribosomal RNA; tRNAs: Transfer RNA; H: Heavy strand; L: Light strand.

## 2.2 蛋白质编码基因分析

蚕豆象线粒体全基因组的 13 个蛋白质编码基因全长为 11139 bp,其中 A、T、C 和 G 的含量分别为 31.81%、43.79%、12.22% 和 12.18%。在所有的蛋白质编码基因的起始密码子使用中,只有 2 个蛋白质编码基因(*cox1* 和 *nad1*)分别使用 ATC 和 TTG 作为起始密码子外,剩余的 11 个蛋白质编码基因都是以常见的 ATA、ATT 和 ATG 作为起始密码子。此外,2 个蛋白质编码基因(*cox2* 和 *nad4*)以不完整的终止密码子 T 作为结尾,其余 11 个蛋白质编码

基因都是以完整的终止密码子 TAA 或 TAG 结尾。

在 13 个蛋白质编码基因的氨基酸使用中,丙氨酸(Ala)的使用频率最多,为 39.72%,苏氨酸(Thr)和半胱氨酸(Cys)使用频率分别为 37.21% 和 13.68%,甘氨酸(Gly)使用频率最少,为 9.37%,其余氨基酸没有使用。13 个蛋白质编码基因的相对密码子使用频率见表 3,密码子使用次数最多的是 AAA,共使用 465 次,密码子使用次数最少的是 CGC,共使用 2 次。

表 3 蚕豆象线粒体基因组 13 个蛋白质编码基因的相对密码子使用频率

Table 3 Relative synonymous codon usage of 13 protein-coding genes of the mitochondrial genome of *B. rufimanus*

密码子 Codon	数量/次 Count	RSCU									
UUU (F)	376	1.56	UCU (S)	100	1.89	UAU (Y)	198	1.41	UGU (C)	28	1.30
UUC (F)	106	0.44	UCC (S)	45	0.85	UAC (Y)	83	0.59	UGC (C)	15	0.70
UUA (L)	335	2.66	UCA (S)	95	1.79	UAA (* )	330	1.57	UGA (W)	73	1.46
UUG (L)	85	0.67	UCG (S)	26	0.49	UAG (* )	90	0.43	UGG (W)	27	0.54
CUU (L)	121	0.96	CCU (P)	70	1.50	CAU (H)	63	1.42	CGU (R)	7	0.70
CUC (L)	54	0.43	CCC (P)	56	1.20	CAC (H)	26	0.58	CGC (R)	2	0.20
CUA (L)	122	0.97	CCA (P)	49	1.05	CAA (Q)	103	1.39	CGA (R)	24	2.40
CUG (L)	39	0.31	CCG (P)	12	0.26	CAG (Q)	45	0.61	CGG (R)	7	0.70
AUU (I)	334	1.58	ACU (T)	90	1.59	AAU (N)	362	1.64	AGU (S)	41	0.77
AUC (I)	90	0.42	ACC (T)	40	0.71	AAC (N)	79	0.36	AGC (S)	32	0.60
AUA (M)	314	1.66	ACA (T)	84	1.49	AAA (K)	465	1.76	AGA (S)	54	1.02
AUG (M)	64	0.34	ACG (T)	12	0.21	AAG (K)	64	0.24	AGG (S)	31	0.58
GUU (V)	56	1.76	GCU (A)	43	1.95	GAU (D)	70	1.40	GGU (G)	33	1.52
GUC (V)	13	0.41	GCC (A)	25	1.14	GAC (D)	30	0.60	GGC (G)	6	0.28
GUA (V)	46	1.45	GCA (A)	17	0.77	GAA (E)	123	1.56	GGA (G)	33	1.52
GUG (V)	12	0.38	GCG (A)	3	0.14	GAG (E)	35	0.44	GGG (G)	15	0.69

RSCU: 相对密码子使用频率; \* : 终止密码子。

RSCU: Relative synonymous codon usage; \* : Stop codon.

### 2.3 tRNA 和 rRNA 基因分析

蚕豆象线粒体全基因组的 22 个转运 RNA 基因的序列全长为 1465 bp, 其中 A、T、C 和 G 的含量分别为 39.39%、37.41%、10.44% 和 12.76%。长度在 63~70 bp。其中 *trnC* 基因序列最短, 为 63 bp, *trnK* 基因序列最长, 为 70 bp。22 个转运 RNA 基因中, 14 个转运 RNA 基因位于 H 链, 8 个转运 RNA 基因位于 L 链。*rnrL* 和 *rnrS* 基因分别位于 L 链。除 *trnS1* 因缺少一个二氢尿嘧啶 (DHU) 臂导致不能形成完整的三叶草结构外, 其余转运 RNA 基因均能形成完整的三叶草结构(图 2)。此外, *trnS1* 的反密码子不是常见的 GCU, 而是 UCU。蚕豆象线粒体基因组的 2 个核糖体 RNA 序列全长为 2062 bp, 其中 A、T、C 和 G 的含量分别为 37.44%、43.36%、6.30% 和 12.90%。*rnrL* 和 *rnrS* 的全长分别为 1284 和 778 bp, A+T 含量分别为 82.01% 和 78.79%, G+C 含量分别为 17.99% 和 21.21%。

### 2.4 系统发育分析

基于最大似然法和贝叶斯法构建的发育分析结果如图 3、4、5 和 6 所示。2 种系统发育分析方法构建的树型拓扑结构都支持茎甲亚科分支类群中的 4 个亚科(豆象亚科、水叶甲亚科、茎甲亚科和负泥虫亚科)为单系群, 且有较高的节点支持值 Bootstrap (BS) ≥ 99、posterior probability (PP) = 1。此外, 茎甲亚科分支类群的内部系统发育关系为茎甲

亚科+(豆象亚科+(水叶甲亚科+负泥虫亚科))。

13 个蛋白质编码基因的核苷酸序列矩阵利用最大似然法、13 个蛋白质编码基因的氨基酸序列矩阵利用贝叶斯法, 在豆象亚科内的系统发育结果均显示, 由于 *Bruchus* sp. EMHAU 15071302 单独形成一支, 蚕豆象与四纹豆象 *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) 形成一支, 分别导致 *Bruchus* 属和 *Callosobruchus* 属形成非单系群。此外, 2 个系统发育结果都强烈支持蚕豆象与四纹豆象的姐妹群关系, 并且具有较高的节点支持值 BS=100、PP=1。其余的 *Caryopemon* 属、*Acanthoscelides* 属为单系群。

使用 Kimura-2-Parameter 模型计算蚕豆象与其他豆象亚科的 9 个物种 (*Caryopemon giganteus*、*Bruchus* sp. EMHAU 15071302、*Callosobruchus analis*、*Callosobruchus chinensis*、*Acanthoscelides obtectus*、*Bruchidius siliquastri*、*Bruchidius uberatus*、*Bruchinae* sp. GENSP01 和 *Callosobruchus maculatus*) 之间的种间遗传距离, 结果显示: 蚕豆象与四纹豆象的遗传距离最近为 0.126; 与 *Bruchinae* sp. GENSP01、*B. uberatus*、*B.* sp. EMHAU 15071302、*A. obtectus*、*C. analis*、*C. chinensis* 和 *C. giganteus* 的遗传距离依次为 0.179、0.180、0.197、0.204、0.217、0.236 和 0.285; 与 *B. fulvipes* 的遗传距离最远, 为 0.330 (表 4)。种间遗传距离与系统发育树所显示的亲缘关系一致支持蚕豆象与四纹豆象为姐妹群关系。

### 3 讨论

本研究利用高通量测序技术首次获得了蚕豆象的线粒体全基因组数据,详细分析和预测了它的线粒体基因组的特点以及 22 个转运 RNA 基因的二级结构,丰富了荳甲亚科分支类群的线粒体基因组数据。蚕豆象线粒体基因组的基因的排列顺序与模式昆虫线粒体基因组排列顺序一致 (Boore, 1999),没有出现线粒体基因的丢失或重排现象。此外,在蛋白质编码基因中,位于 H 链上的蛋白质

编码基因的 AT 含量 (73.8%) 和 GC 偏倚 (-0.144) 低于 L 链上蛋白质编码基因的 AT 含量 (78.4%) 和 GC 偏倚 (0.275),但 H 链上的蛋白质编码基因的 AT 偏倚 (-0.111) 高于 L 链上的 AT 偏倚 (-0.23)。在 tRNA 基因里,位于 H 链上的 tRNA 基因 AT 含量 (78.2%) 和 AT 偏倚 (0.036) 高于 L 链上 tRNA 基因 AT 含量 (74.4%) 和 AT 偏倚 (0.008),但 H 链上 tRNA 基因的 GC 偏倚 (0.005) 低于 L 链上的 GC 偏倚 (0.241)。

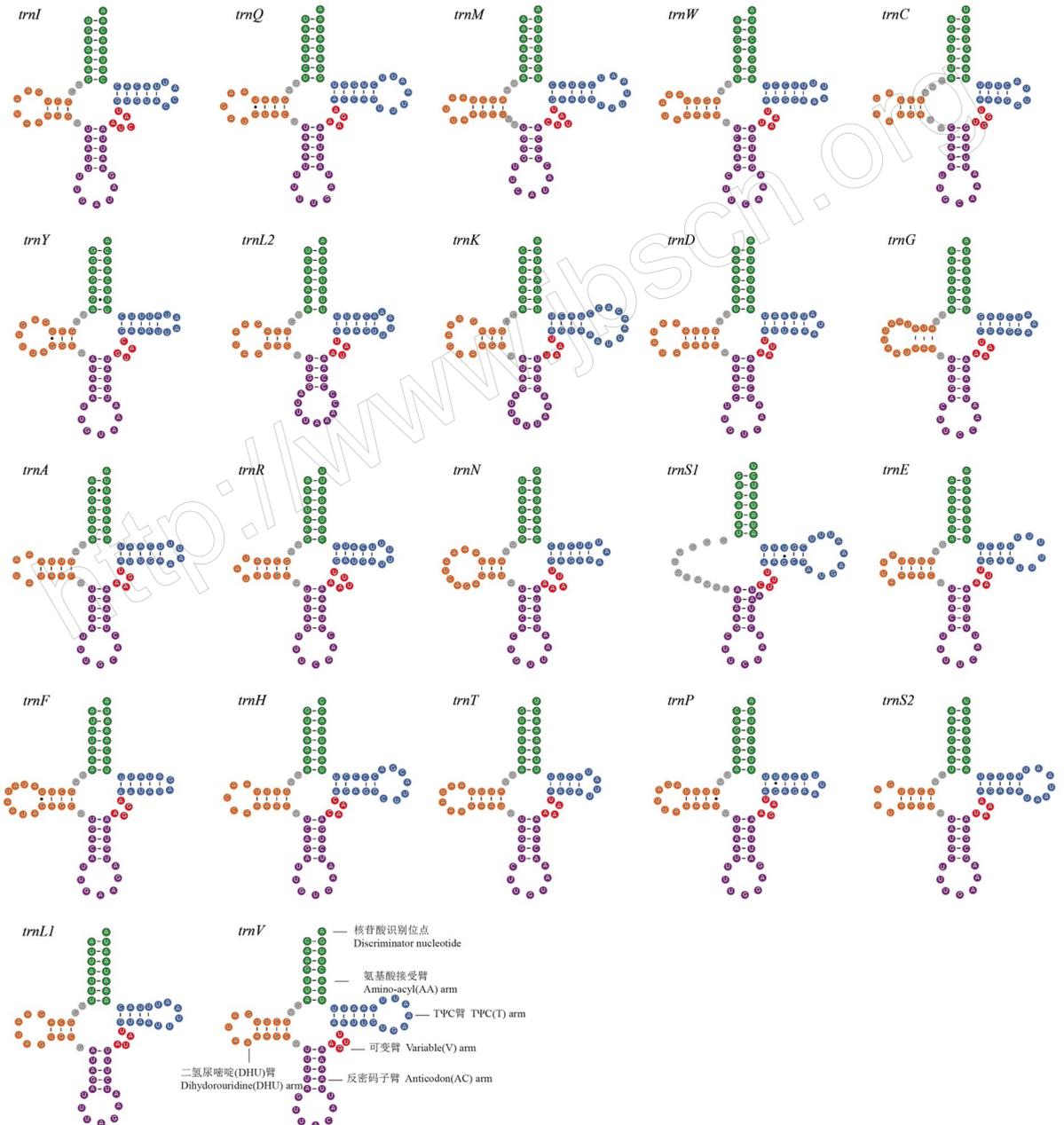


图 2 蚕豆象 22 个 tRNA 基因的二级结构

Fig.2 Secondary structure of 22 tRNAs genes of *B. rufimanus*

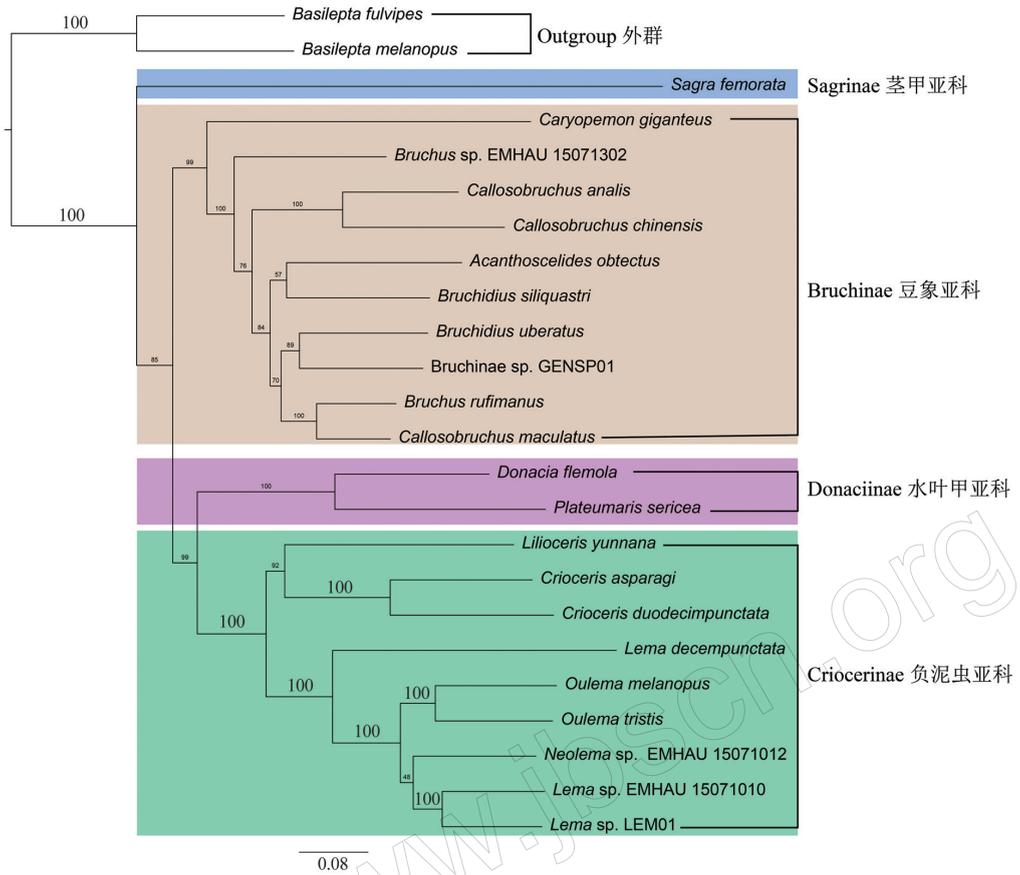


图 3 基于 13 个蛋白编码基因的核苷酸序列构建的最大似然树

Fig.3 Maximum likelihood tree inferred from the nucleotide sequences of 13 protein-coding genes

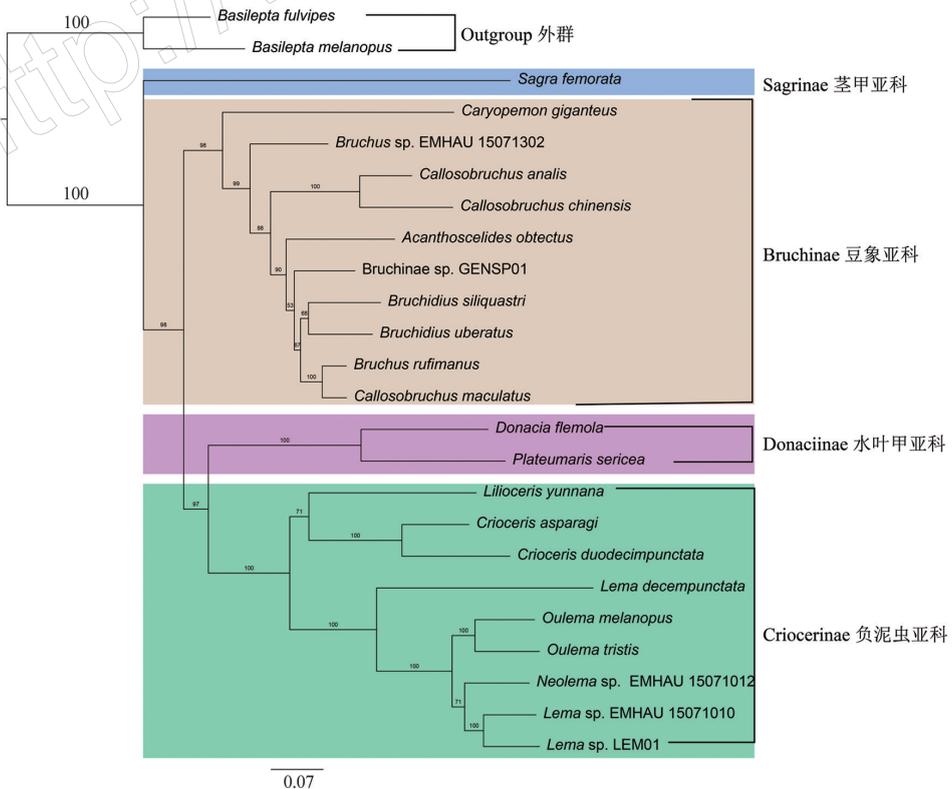


图 4 基于 13 个蛋白编码基因的氨基酸序列构建的最大似然树

Fig.4 Maximum likelihood tree inferred from the amino acid sequences of 13 protein-coding genes

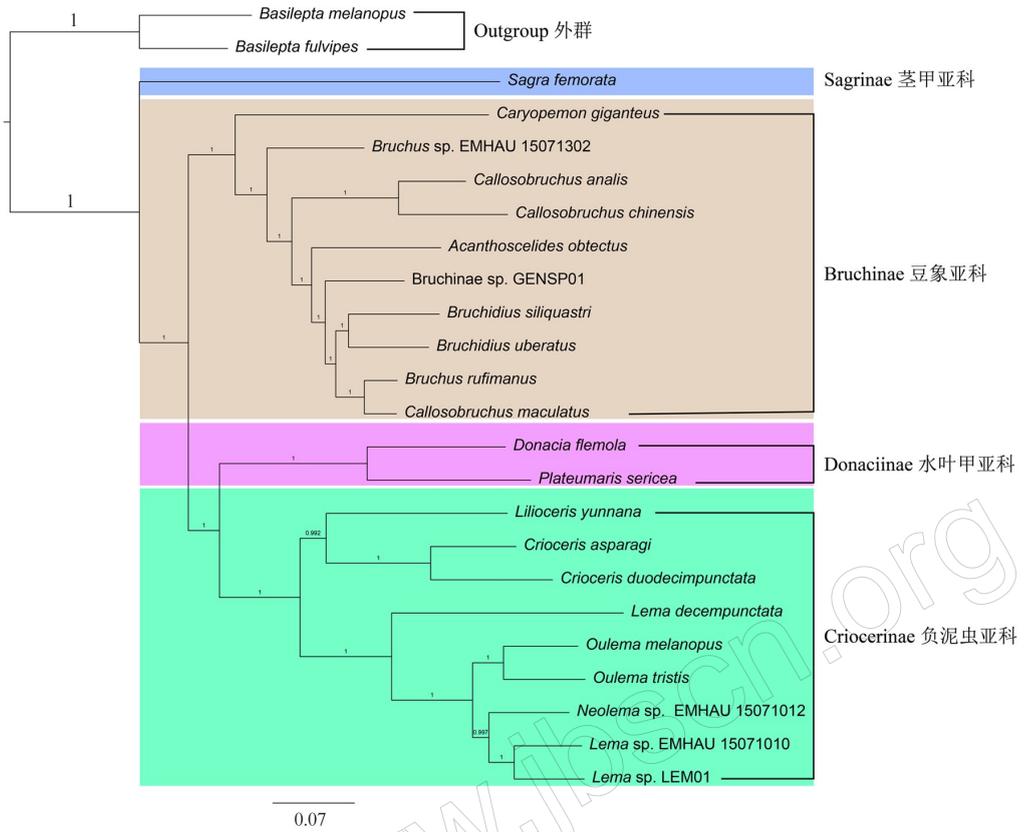


图 5 基于 13 个蛋白编码基因的氨基酸序列构建的贝叶斯树

Fig.5 Bayesian tree inferred from the amino acid sequences of 13 protein-coding genes

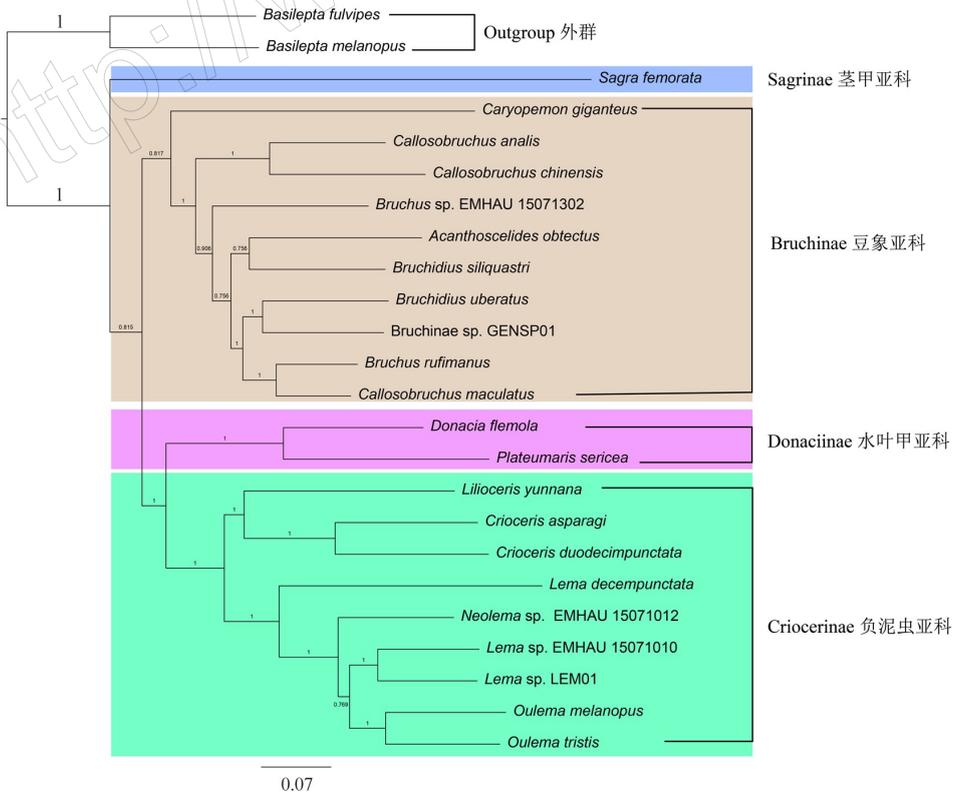


图 6 基于 13 个蛋白编码基因的核苷酸序列构建的贝叶斯树

Fig.6 Bayesian tree inferred from the nucleotide sequences of 13 protein-coding genes

表 4 蚕豆象与其他豆象亚科昆虫的线粒体蛋白质编码基因基于 Kimura-2-Parameter 模型的遗传距离  
Table 4 Pairwise genetic distances of mitochondrial protein-coding gene sequences of *B. rufimanus* and other species of Bruchinae based on Kimura-2-Parameters

种 Species	<i>Acanthoscelides obtectus</i>	<i>Basilepta fulvipes</i>	<i>Bruchidius uberatus</i>	Bruchinae sp.	<i>Bruchus rufimanus</i>	<i>Bruchus</i> sp. EMHAU	<i>Callosobruchus analis</i>	<i>Callosobruchus chinensis</i>	<i>Callosobruchus maculatus</i>	<i>Caryopemon giganteus</i>
<i>Acanthoscelides obtectus</i>										
<i>Basilepta fulvipes</i>	0.351									
<i>Bruchidius uberatus</i>	0.216	0.331								
Bruchinae sp.	0.221	0.331	0.184							
<i>Bruchus rufimanus</i>	0.204	0.330	0.180	0.179						
<i>Bruchus</i> sp.	0.236	0.329	0.214	0.201	0.197					
<i>Callosobruchus analis</i>	0.249	0.348	0.226	0.232	0.217	0.237				
<i>Callosobruchus chinensis</i>	0.259	0.348	0.239	0.237	0.236	0.252	0.201			
<i>Callosobruchus maculatus</i>	0.199	0.311	0.171	0.170	0.126	0.188	0.215	0.229		
<i>Caryopemon giganteus</i>	0.308	0.368	0.289	0.295	0.285	0.286	0.315	0.318	0.279	

本研究构建了茎甲亚科分支类群的系统发育关系, 研究结果与 Zhang *et al.* (2022) 的研究结果一致, 支持茎甲亚科分支类群的 4 个亚科茎甲亚科、豆象亚科、水叶甲亚科和负泥虫亚科为单系群。此外, 本文研究结果也支持豆象亚科与水叶甲亚科+负泥虫亚科形成姐妹群, 这一结果与 Reid (1995, 2000)、Farrell & Sequeira (2004)、Bocak *et al.* (2014) 研究结论一致。但是, Gomez-Zurita *et al.* (2008) 基于叶甲科 167 个物种的 2 个核基因片段 (18S rRNA 和 28S rRNA) 和一个线粒体基因片段 (*rrnL*) 构建的茎甲亚科分支类群系统发育关系仍不清晰, Mckenna *et al.* (2015) 基于鞘翅目 367 个物种的 8 个核基因片段重建的系统发育结果支持豆象亚科和负泥虫亚科聚为一支。由此可知, 目前关于豆象亚科的姐妹群关系仍然存在争议, 还需进一步深入研究。

2 种系统发育分析与种间遗传距离一致显示, 蚕豆象与四纹豆象形成姐妹群关系且有较高的节点支持值 BS = 100、PP = 1 和较近的遗传距离 0.126。这一现象可能是由于这 2 种昆虫在生活习性等方面具有较多的共同特点形成的。本研究丰富了茎甲亚科分支类群的线粒体基因组数据, 可为后续茎甲亚科分支类群和豆象亚科的系统发育以及蚕豆象的种群遗传学等研究提供数据支持。

参考文献

丁国卫, 赵万千, 唐煜, 张廷礼, 曾建兵, 2006. 临夏州蚕豆象的生物学特性及防治措施研究. 甘肃农业科技 (3): 14-16.  
董亮, 2011. 青海蚕豆象的发生与防治. 青海农林科技

(3): 20-21.  
来有鹏, 2019. 蚕豆象的发生与防控研究进展. 植物检疫, 33(3): 58-62.  
林兴雨, 翟卿, 宋南, 尹新明, 2022. 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. [2023-02-06]. DOI: 10.16445/j.cnki.1000-2340.20220920.001.  
王昶, 张丽娟, 郭延平, 闵庚梅, 2018. 6 种杀虫剂对蚕豆象成虫的室内毒力测定及田间药效评价. 植物保护, 44(4): 207-211.  
徐淑华, 2012. 蚕豆象在青海省的适生性风险分析. 中国植保导刊, 32(4): 57-58.  
BERNT M, DONATH A, JUHLING F, EXTERNBRINK F, FLORENTZ C, FRITZSCH G, PÜTZ J, MIDDENDORF M, STADLER P F, 2013. MITOS: improved *de novo* metazoan mitochondrial genome annotation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69(2): 313-319.  
BIDDLE A, CATLIN N, 2007. Pests, diseases, and disorders of peas and beans: a colour handbook. London: Manson Publishing Ltd.  
BOCAK L, BARTON C, CRAMPTON-PLATT A, CHESTERS D, AHRENS D, VOGLER A P, 2014. Building the Coleoptera tree-of-life for > 8000 species: composition of public DNA data and fit with Linnaean classification. *Systematic Entomology*, 39(1): 97-110.  
BOORE J L, 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, 27(8): 1767-1780.  
CAPELLA-GUTIÉRREZ S, SILLA-MARTÍNEZ J M, GABALDÓN T, 2009. TrimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, 25(15): 1972-1973.  
FARRELL B D, SEQUEIRA A S, 2004. Evolutionary rates in the adaptive radiation of beetles on plants. *Evolution*, 58(9): 1984-2001.

- GILLET C P D T, CRAMPTON-PLATT A, TIMMERMANS M J T N, JORDAL B H, EMERSON B C, VOGLER A P, 2014. Bulk *de novo* mitogenome assembly from pooled total DNA elucidates the phylogeny of weevils (Coleoptera: Curculionioidea). *Molecular Biology and Evolution*, 31(8): 2223.
- GAILIS J, ASTAŠOVA N, JĀKOBSONE E, OZOLINA-POLE L, 2022. Biology of broad bean seed beetle (*Bruchus rufimanus*; Coleoptera: Chrysomelidae) in Latvia. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B—Soil & Plant Science*, 72(1): 4–16.
- GÓMEZ-ZURITA J, HUNT T, VOGLER A P, 2008. Multilocus ribosomal RNA phylogeny of the leaf beetles (Chrysomelidae). *Cladistics*, 24(1): 34–50.
- GREINER S, LEHWARK P, BOCK R, 2019. OrganelleGenomeDRAW (OGDRAW) version 1.3.1: expanded toolkit for the graphical visualization of organellar genomes. *Nucleic Acids Research*, 47(1): 59–64.
- JIN J J, YU W B, YANG J B, SONG Y, DEPAMPHILIS C W, YI T S, LI D Z, 2020. GetOrganelle: a fast and versatile toolkit for accurate *de novo* assembly of organelle genomes. *Genome Biology*, 21: 1–31.
- KATOH K, STANDLEY D M, 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4): 772–780.
- KÜCK P, LONGO G C, 2014. FASconCAT-G: extensive functions for multiple sequence alignment preparations concerning phylogenetic studies. *Frontiers in Zoology*, 11: 1–8.
- MCKENNA D D, WILD A L, KANDA K, BELLAMY C L, BEUTEL R G, CATERINO M S, FARNUM C W, HAWKS D C, IVIE M A, JAMESON M L, LESCHEN R A B, MARVALDI A E, MCHUGH J V, NEWTON A F, ROBERTSON J A, THAYER M K, WHITING M F, LAWRENCE J F, ŚLIPINSKI A, MADDISON D R, FARRELL B D, 2015. The beetle tree of life reveals that Coleoptera survived end-Permian mass extinction to diversify during the Cretaceous terrestrial revolution. *Systematic Entomology*, 40(4): 835–880.
- MENDESIL E, KUYU C G, ANDERSON P, 2022. Effects of storage in triple-layer hermetic bags on stored field pea grain quality and infestation by the pea weevil, *Bruchus pisorum* L. (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research*, 95: 101919.
- NGUYEN L T, SCHMIDT H A, VON HAESELER A, MINH B Q, 2015. IQ-tree: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1): 268–274.
- PERNA N T, KOCHER T D, 1995. Patterns of nucleotide composition at fourfold degenerate sites of animal mitochondrial genomes. *Journal of Molecular Evolution*, 41: 353–358.
- REID C A, 1995. A cladistic analysis of subfamilial relationships in the Chrysomelidae sensu lato (Chrysomeloidea). *Biology, Phylogeny, and Classification of Coleoptera (Papers Celebrating the 80th Birthday of Roy A. Crowson)*, 2: 559–631.
- REID C A, 2000. Spilopyrinae Chapuis: a new subfamily in the Chrysomelidae and its systematic placement (Coleoptera). *Invertebrate Systematics*, 14(6): 837–862.
- RONQUIST F, TESLENKO M, VAN DER MARK P, AYRES D L, DARLING A, HÖHNA S, LARGET B, LIU L, SUCHARD M A, HUELSENBECK J P, 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3): 539–542.
- SEGERS A, MEGIDO R C, LOGNAY G, FRANCIS F, 2021. Overview of *Bruchus rufimanus* Boheman 1833 (Coleoptera: Chrysomelidae): biology, chemical ecology and semiochemical opportunities in integrated pest management programs. *Crop Protection*, 140: 105411.
- SONG N, YIN X, ZHAO X, CHEN J, YIN J, 2018. Reconstruction of mitogenomes by NGS and phylogenetic implications for leaf beetles. *Mitochondrial DNA A*, 29: 1041.
- TAMURA K, STECHER G, KUMAR S, 2021. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7): 3022–3027.
- TRAN B, DARQUENNE J, HUIGNARD J, 1993. Changes in responsiveness to factors inducing diapause termination in *Bruchus rufimanus* (Boh.) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Insect Physiology*, 39: 769–774.
- ZHANG H, SONG N, YIN X, 2022. Higher-level phylogeny of Chrysomelidae based on expanded sampling of mitogenomes. *PLoS ONE*, 17(1): e0258587.

(责任编辑:郭莹)