

长小蠹亚科类昆虫分子鉴定技术研究进展

方文渊¹, 吴志毅^{1,2*}, 张文俊², 田宏伟¹, 程帆¹, 黄凌哲², 吴颖¹, 陈哲^{1,2}

(1. 浙江省检验检疫科学技术研究院, 浙江杭州 311215; 2. 浙江出入境检验检疫局, 浙江杭州 310016)

摘要 长小蠹亚科(Platypodinae)是一类重要的木材害虫。目前, DNA条形码技术在昆虫鉴定中的应用已经较为成熟, 但在长小蠹类昆虫中的鉴定工作应用较少。该研究概述 DNA条形码技术的原理及应用, 探讨 DNA条形码技术在长小蠹检疫鉴定应用中的前景。

关键词 长小蠹亚科; 木材; 害虫; 检疫鉴定; DNA条形码

中图分类号 Q969.514.6 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)30-0032-03

Research Progress of Molecular Identification on Platypodinae

FANG Wen-yuan¹, WU Zhi-yi^{1,2}, ZHANG Wen-jun² et al (1. Zhejiang Academy of Science and Technology for Inspection and Quarantine, Hangzhou, Zhejiang 311215; 2. Zhejiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Hangzhou, Zhejiang 310016)

Abstract Platypodinae are one kind of important wood pests. At present, the application of DNA barcode technology in insect identification has been relatively mature, but there are few applications in this group. Application prospect of DNA barcoding technology in the identification of Platypodinae was explored on the basis of summarizing the principles and applications of DNA barcode technology.

Key words Platypodinae; Timber; Pest; Quarantine identification; DNA barcode

长小蠹类昆虫隶属鞘翅目(Coleoptera)象甲科(Curculionidae)长小蠹亚科(Platypodinae), 该亚科昆虫又称“食菌小蠹”(ambrosia beetles)或“针孔小蠹”(pinhole beetles), 世界已知种类 1 500 余种^[1-2]。该类害虫主要为害树木及木材^[3], 在木质部内营钻蛀寄生生活, 虫道纵横交错, 虫道内常有伴生菌, 导致木材变质, 严重影响木材质量, 降低木材的使用价值, 有些种类还可传播树木病害, 加速植物死亡; 其为害的寄主有些为豆科紫檀属、黄檀属等名贵树木或木材, 是一类具有重要经济意义的林木害虫。因长小蠹类昆虫危害大, 易通过人为传播, 扩散防治困难, 对其的检疫工作受到世界许多国家的重视。新西兰、澳大利亚、日本、美国等国家均将长小蠹的部分类群确定为检疫性有害生物。2007 年我国发布的《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》中, 异胫长小蠹属非中国种及长小蠹属非中国种被确定为检疫性有害生物。

20 世纪以来, 随着国际贸易的不断增长, 长小蠹类昆虫随木材及木质包装在各国扩散风险日益增大。日本检疫部门从进境原木中截获大量的长小蠹, 并发现一些新种^[4]。美国和加拿大检疫部门从进境木材中截获 10 余种长小蠹类有害昆虫, 部分种类已在北美地区定殖^[5]。20 世纪末期至今, 国家对进口木材一直实行零关税政策; 同时我国对木材量需求逐年增长, 近 10 余年来, 我国原木、板材等木材进口量大幅增长, 年均增长 20% 以上。随着木材的大量进境, 疫情检出率逐年升高, 在截获的众多有害生物中, 长小蠹是截获频次较多的一大类林木害虫, 口岸检验检疫部门每年都从进境木材中截获大量的长小蠹, 年均增长 15%。同时长小蠹的一些种类具有很强的扩散入侵性。

随着木材的大量进口, 伴随着大量的长小蠹昆虫的发生, 使我国森林生态和木材资源受到极大的威胁, 造成巨额的损失, 且该类害虫的传播、入侵能力较强, 一旦入侵, 将会对入侵地区产生严重危害。例如, 原产非洲的平行长小蠹(*Euplatypus parallelus*), 后随原木、木质包装等传入澳洲和东南亚等国家和地区^[2,6], 现已广布于东南亚地区。柱体长小蠹(*Platypus cylindrus*), 原发生于欧洲少数国家, 后来传播扩散到欧洲大部分地区^[7]。

目前, 我国对国内外长小蠹类形态学系统分类鉴定、显微形态鉴定等研究均较少, 许多方面尚为空白。口岸植物检疫部门在进境木材中截获的该类昆虫检疫鉴定方面还较薄弱, 对一些潜在危险性类群的检疫鉴定还无法解决。植检技术人员因相关检疫鉴定资料专著、文献等的缺乏, 进境木材截获的长小蠹类部分种类只能鉴定到科、属级的水平。这种现状对出入境检疫部门进一步研究和掌握国外该类昆虫中重要木材害虫种类、危害性及防疫工作十分不利, 影响对国外该类昆虫潜在危险性种类科学、合理地确定。同时, 由于长小蠹类的鉴定对分类专业水平要求高, 且需长期从事检疫鉴定积累经验。因此, 一种简便而快速的检疫鉴定方法对于该类害虫的防治具有重要意义, 查阅大量文献发现 DNA条形码技术在昆虫的分类鉴定中具有独特的优势, 因此, 我们期望通过 DNA条形码技术对长小蠹类昆虫进行快速检疫鉴定。

1 DNA条形码技术及原理

自林奈建立双命名法以来, 有 170 多万物种被命名, 在此过程中形态学家需要付出极大的努力, 而传统物种鉴定方法存在一定的局限性。物种的表型可塑性、遗传变异性、对专业知识的高要求性等, 导致鉴定错误非常普遍。为了克服这些问题, 学者们提出通过 DNA对物种进行鉴定^[8-11]。

2003 年 3 月, 美国冷泉港召开 Taxonomy and DNA 会议, 在这次会议上, 加拿大科学家 Hebert 等^[12-13]首次提出 DNA Barcode 的概念, 即生物体内能够代表该物种的、标准的、有

基金项目 浙江检验检疫局项目(ZK201622); 国家质检总局项目(2016IK283)。

作者简介 方文渊(1990—), 男, 浙江桐庐人, 助理农艺师, 硕士, 从事昆虫、细菌等植物有害生物检疫鉴定工作。*通讯作者, 高级农艺师, 博士, 从事昆虫检疫鉴定等植物检疫工作。

收稿日期 2018-06-15

足够变异的、易扩增且相对较短的 DNA 片段,自 DNA 条形码技术被提出后,在短短几年中大量的物种条形码基因被测定。

众所周知,A、T、C 和 G 4 种碱基的排列构成基因的信息存于 DNA 中,每个位点都可以由这 4 种碱基组成,那么一条含有 n 个碱基组成的基因,可能形成的序列就有 $4n$ 种。10 亿个物种编码序列只需 15 个碱基就可以,虽然实际上碱基的排列并不是随机排列,部分位点存在高度的保守性,但是从理论上可以确定一段几百个碱基组成的序列也足以包含能够鉴定该物种的信息^[14]。

2003 年加拿大科学家 Hebert 等^[12]提出以线粒体细胞色素氧化酶亚基 I(COI)基因 5'端 648 bp 的序列作为标准,建立 DNA 条形码物种鉴定系统。Hebert 等^[12-13]通过对 7 个不同门的中 100 个物种进行分析,研究 COI 基因的组成,结果表明通过 COI 基因的系统发育分析可将 96% 的物种分类到正确的门中。此后又对地球上物种丰富度最高的六足纲进行同样的分析^[15],选择的研究对象为其中物种丰度最高的 8 目 100 属,并表明指定的 50 个新分类群的正确顺序。最后,他们通过对 COI 序列的测定,了解该基因对鳞翅目昆虫正确鉴定的能力,由于在这个属之间的序列差异最低。因此,对鳞翅目昆虫物种鉴定具有极大的挑战性,而且该目中昆虫物种数最多。在这个测试中,涉及到 200 个亲缘关系密切的物种,随后分析结果对 150 个新物种进行鉴定,结果鉴定成功率为 100%。自此,开启了以 COI 作为物种鉴定标准的热潮。

2 DNA 条形码技术在长小蠹及其他昆虫中的应用

2.1 DNA 条形码技术在长小蠹类昆虫分类鉴定中的应用

DNA 条形码技术在长小蠹类昆虫的应用相对较少,国内外的相关研究报道也较少。王银竹等^[16]通过线粒体基因 COI 基因 5'端的 549 bp 序列对长小蠹科 5 属 10 种进行的系统进化研究,结果表明根据 MP、ML 及 NJ 构建的系统进化树中,NJ 树显示的进化关系与 Wood 等^[2]及 Bright^[1]提出的最新长小蠹分类系统一致。历史上长小蠹类昆虫分类一直比较混乱,且分类地位也存在争议,通过分子手段对长小蠹的研究表明,最新的分类系统与分子研究结果相一致。由于长小蠹类昆虫的分子研究极其缺乏,对现有的分类系统的佐证缺乏大量的数据,因此对于 DNA 条形码技术在长小蠹类昆虫中的应用迫在眉睫。此外,王银竹^[17]通过反向杂交技术(PCR-RDB)对长蠹科及长小蠹科 22 种昆虫进行快速检疫鉴定研究。通过线粒体基因 COI 序列,构建特异性反向杂交探针,通过探针与特定序列的结合,实现 9 种长蠹、9 种长小蠹及 3 种小蠹的快速鉴定,灵敏度达到 pg 级。

Jordal^[18]对长小蠹科 80 种以及 8 个外类群进行系统进化研究,通过 COI、EF-1 α 、CAD、ArgK 和 28S 5 个基因构建系统进化树。结果显示 Tesserocerini、Notoplatypus 和 Platypodini 为 3 个姊妹群,且在进化中 Tesserocerini 和 Notoplatypus 最早出现分化;从进化树中可以看出,各属的关系比较混乱,并不能形成一个独立的分枝,表明现有的分类并不能与分子鉴定结果形成统一的结论。由于长小蠹类昆虫的分子数据匮

乏,现有的分子数据与形态学分类结果存在较大的出入,因此对长小蠹分类研究我们还有许多工作需要完成,最终形成分子鉴定结果与形态特征相一致的结果。

2.2 DNA 条形码技术在其他昆虫中的应用

对于昆虫而言,线粒体基因 COI 为母系遗传基因,作为系统发育研究的条形码基因无疑可以满足大部分昆虫分类鉴定的需求。最初,COI 基因中 648 bp 的基因被作为标准的条形码基因用于物种鉴定,被广泛的认可;随后的研究中,发现 COI 基因 5'端的 100 bp 片段在用于博物馆样品鉴定中也同样具有很高的鉴定成功率^[19],最后,通过大量的研究证明该片段对于真核生物的鉴定中也同样具有非常高的成功率。COI 基因作为 DNA 条形码基因被广泛用于物种的鉴定,同样也是评价生物多用性的分子手段。除了线粒体基因中的 COI 基因被广泛用于物种鉴定外,线粒体基因中其他 12 个蛋白编码基因,以及核糖体基因 12sRNA 和 16sRNA 也被用于物种的鉴定。

近年来,DNA 条形码技术在等翅目^[20]、鞘翅目^[21]、蜻蜓目^[22]、直翅目^[23]、弹尾目^[24]、蜉蝣目^[25]等中均已开展。

2.3 DNA 条形码的局限性

任何一种方法都不可能是万能的,DNA 条形码在物种鉴定方面有着得天独厚的优势,同样也存在它的局限性^[26]。基于 DNA 的物种分类鉴定的方法是依据种间和种内遗传变异,但是对于近期分化的新种鉴定显得比较困难,而且也不存在一个通用基因或者单一的一个基因作为 DNA 条形码基因就能对所有的物种进行分类鉴定,这也是不切实际的。DNA 条形码的鉴定是基于现在已经确定的物种,对其基因进行大数据分析才得到的。这就需要大量的科学家尤其是传统生物分类学家、分子生物学家、统计学家以及生物信息学家等相互合作,此外也需要许多的研究机构的合作、信息的互通才能建立 DNA 条形码的数据库,从而为今后物种鉴定分类做好前期基础性工作。

DNA 条形码基因通常选择 500~1 000 bp 的片段,这个长度相对于一个物种而言是非常短的,包含的信息也相对较少,因此在对于一些物种的鉴定中仍然会出现分析错误的现象,当然对于物种进化关系的深入研究数据量可能也不够。对于通过 DNA 条形码技术对物种进行鉴定的应用价值仍然存在争议,这种分类方法无疑降低了传统的形态学分类鉴定方法的难度,但是物种的分类只单独通过基因的方法显然也会增加鉴定错误的可能性。

3 展望

尽管 DNA 条形码的分类鉴定方法存在许多问题,但是该方法在物种分类鉴定中仍然存在极大的优势^[27-28]。因此,应该大力发展基于 DNA 的分类鉴定的方法,利用其快速、简便、所需鉴定人员少等优点,使其为地球生物的起源、进化的研究带来质的改变。正如基于 DNA 条形码分类鉴定的优势和局限性,我们应将 DNA 序列、形态学以及生态学相互结合,这样才能更加准确地对物种进行分类鉴定。通过 DNA 条形码技术无疑大大加快了地球物种分类鉴定的速度,大量的研究也同样证明该方法的可行性。

长小蠹类昆虫由于具有种类繁多、形态特征相似度高特点,给形态学家带来了诸多困难。在口岸截获的长小蠹类昆虫,许多样品均为卵、幼虫、蛹及残肢,无法从形态上进行鉴定,因此通过 DNA 条形码技术可以快速方便地进行检疫鉴定,可为害虫的风险分析打下基础。此外,截获的样品由于时间原因,虫体内的部分 DNA 已经降解,可以通过研究开发微型 DNA 条形码(Mini DNA barcoding),从而增强 DNA 条形码技术在长小蠹类昆虫的检疫鉴定应用研究。由于长小蠹类昆虫在国内外通过分子鉴定研究的匮乏,我们需要加大对该方面的研究,增加长小蠹类昆虫的 DNA 条形码数据库。不仅可以加快长小蠹类昆虫的遗传进化关系的研究,而且对于检疫部门对该类害虫的截获、风险分析、防治均具有重要的指导意义。

参考文献

- [1] BRIGHT D E A Catalog of Scolytidae and Platypodidae (Coleoptera), Supplement 3(2000–2010), with notes on subfamily and tribal reclassifications [J]. *Insecta mundi*, 2014, 356: 1–336.
- [2] WOOD S L, BRIGHT D E A Catalog of Scolytidae and Platypodidae (Coleoptera), Part 2: Taxonomic index. Volume A [J]. *Great basin naturalist memoirs*, 1992, 13: 1–833.
- [3] 徐浪, 陈志彝, 张仲峰, 等. 深圳口岸全国首次截获检疫性害虫双刺长小蠹[J]. *植物检疫*, 2015(2): 14.
- [4] BROWNE F G. Some new species of scolytidae and platypodidae from africa and the seychelles islands (coleoptera) [J]. *Revue de zoologie Africaine*, 1980, 94: 773–779.
- [5] HAACK R A. Exotic bark-and wood-boring Coleoptera in the United States: Recent establishments and interceptions [J]. *Canadian journal of forest research*, 2006, 36(2): 269–288.
- [6] BEAVER R. New records of bark and ambrosia beetles from Thailand (Coleoptera: Scolytidae) [J]. *Serangga*, 1999, 4: 175–183.
- [7] BRIGHT D E, BOUCHARD P. Coleoptera, Curculionidae, Entiminae [R]. 2002.
- [8] HEBERT P D N, PENTON E H, BURNS J M, et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(41): 14812–14817.
- [9] HEBERT P D N, PENTON E H, BURNS J M, et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc Natl Acad Sci USA* [J]. *Proceedings of the national academy of sciences*, 2004, 101(41): 14812–14817.
- [10] 叶兼菱, 安榆林, 钱路, 等. 检疫性昆虫 DNA 条形码检测技术的研发与应用实例[J]. *应用昆虫学报*, 2015, 52(2): 382–389.
- [11] 宋南, 刘杰, 彩万志, 等. DNA 条形码在昆虫分类中的应用[J]. *四川动物*, 2013, 32(3): 470–474.
- [12] HEBERT P D N, RATNASINGHAM S, DE WAARD J R. Barcoding animal life: Cytochrome *c* oxidase subunit I divergences among closely related species [J]. *Proceedings biological sciences*, 2003, 270: 96–99.
- [13] HEBERT P D, STOECKLE M Y, ZEMPLAK T S, et al. Identification of birds through DNA barcodes [J]. *PLoS Biology*, 2004, 2(10): 1657–1663.
- [14] 肖金花, 肖晖, 黄大卫. 生物分类学的新动向——DNA 条形码编码[J]. *动物学报*, 2004, 50(5): 852–855.
- [15] NOVOTNY V, BASSET Y, MILLER S E, et al. Low host specificity of herbivorous insects in a tropical forest [J]. *Nature*, 2002, 416(6883): 841–844.
- [16] 王银竹, 余道坚, 张润杰, 等. 基于 mtDNA COI 基因的十种长小蠹分子系统进化研究(鞘翅目: 长小蠹科) [J]. *昆虫学报*, 2010, 53(4): 457–463.
- [17] 王银竹. 长蠹科和长小蠹科昆虫 PCR-RDB 鉴定技术及其分子系统进化研究[D]. 广州: 中山大学, 2010.
- [18] JORDAL B H. Molecular phylogeny and biogeography of the weevil subfamily Platypodinae reveals evolutionarily conserved range patterns [J]. *Molecular phylogenetics & evolution*, 2015, 92: 294–307.
- [19] MEUSNIER I, SINGER G A C, HICKEYD A, et al. A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis [J]. *BMC Genomics*, 2008, 9(1): 214.
- [20] FOSTER B T, COGNATO A I, GOLD R E. DNA-based identification of the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae) [J]. *Journal of economic entomology*, 2004, 97(1): 95–101.
- [21] MONAGHAN M T, BALKE M, GREGORY T R, et al. DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers [J]. *Philosophical transactions biological sciences*, 2005, 360(1462): 1925–1933.
- [22] RACH J, DESALLE R, SARKAR I N, et al. Character-based DNA barcoding allows discrimination of genera, species and populations in Odonata [J]. *Proc Biol Sci*, 2008, 275(1632): 237–247.
- [23] 潘程莹, 胡婧, 张霞, 等. 斑腿蝗科 Catantopidae 七种蝗虫线粒体 COI 基因的 DNA 条形码研究[J]. *昆虫分类学报*, 2006, 28(2): 103–110.
- [24] HOGG I D, HEBERT P D N. Biological identification of springtails (Hexapoda: Collembola) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes [J]. *Canadian journal of zoology*, 2004, 82(5): 749–754.
- [25] BALL S L, HEBERT P D N, BURIAN S K, et al. Biological identification of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes [J]. *Freshwater science*, 2005, 24(3): 508–524.
- [26] 杨倩倩, 李志红, 伍祎, 等. 线粒体 COI 基因在昆虫 DNA 条形码中的应用[J]. *应用昆虫学报*, 2012, 49(6): 1687–1695.
- [27] 刘勇, 宋毓, 李晓宇. 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[J]. *植物检疫*, 2010, 24(2): 46–50.
- [28] 赵广宇, 李虎, 杨海林, 等. DNA 条形码技术在昆虫学中的应用[J]. *植物保护学报*, 2014, 41(2): 129–141.

名词解释

扩展总被引频次: 指该期刊自创刊以来所登载的全部论文在统计当年被引用的总次数。这是一个非常客观实际的评价指标, 可以显示该期刊被使用和受重视的程度, 以及在科学交流中的作用和地位。

扩展影响因子: 这是一个国际上通行的期刊评价指标, 是 E·加菲尔于 1972 年提出的。由于它是一个相对统计量, 所以可公平地评价和处理各类期刊。通常, 期刊影响因子越大, 它的学术影响力和作用也越大。具体算法为:

$$\text{扩展影响因子} = \frac{\text{该刊前 2 年发表论文在统计当年被引用的总次数}}{\text{该刊前 2 年发表论文总数}}$$

扩展即年指标: 这是一个表征期刊即时反应速率的指标, 主要描述期刊当年发表的论文在当年被引用的情况。具体算法为:

$$\text{扩展即年指标} = \frac{\text{该期刊当年发表论文在统计当年被引用的总次数}}{\text{该期刊当年发表论文总数}}$$

扩展他引率: 指该期刊全部被引次数中, 被其他刊引用次数所占的比例。具体算法为:

$$\text{扩展他引率} = \frac{\text{被其他刊引用的次数}}{\text{期刊被引用的总次数}}$$

扩展引用刊数: 引用被评价期刊的期刊数, 反映被评价期刊被使用的范围。