

## 十二齿小蠹形态特征及 DNA 条形码技术快速鉴定研究

胡淑青<sup>1</sup>, 李献锋<sup>1\*</sup>, 魏霜<sup>1</sup>, 丁钊<sup>2</sup>

(1. 广州海关技术中心, 广东广州 510623; 2. 广州白云机场海关综合技术服务中心, 广东广州 510470)

**摘要** 介绍了我国口岸进口木材中多次截获的松十二齿小蠹, 对该虫的分类地位、分布、寄主、危害及成虫形态特征进行了描述。将获得的该虫 COI 序列通过 GenBank 数据库比对分析, 以及用邻接法 (NJ) 构建的系统发育树, 建立了该虫的 DNA 条形码检测方法, 以期为口岸一线的检测鉴定提供参考。

**关键词** 十二齿小蠹; 分布; 形态特征; DNA 条形码

中图分类号 S41-30 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)10-0119-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.10.027



开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):

### Morphological Character and DNA Barcoding Technique Rapid Identification of *Ips sexdentatus*

HU Shu-qing, LI Xian-feng, WEI Shuang et al (Guangzhou Customs Technology Center, Guangzhou, Guangdong 510623)

**Abstract** *Ips sexdentatus* frequently intercepted in imported wood from domestic port was described based on its classification, distribution, host plants, harm, morphological characteristics, etc. CO I sequence was blasted with released data in GenBank, and phylogenetic tree based on the Neighbor-Joining Algorithm (NJ) was constructed, and finally DNA barcoding technique indentifying this pest was created, with the hope that it will provide references on inspection and identification of port line.

**Key words** *Ips sexdentatus*; Distribution; Morphological characteristics; DNA barcode

十二齿小蠹 [*Ips sexdentatus* (Boerner, 1767)], 又名松十二齿小蠹, 是古北区林业重要蛀干害虫, 被列入我国林业危险性有害生物名录, 其主要危害松属、云杉属植物等针叶树<sup>[1-2]</sup>。近年来, 我国口岸多次从进境的木材和木质包装中截获十二齿小蠹活幼虫和成虫。笔者介绍了十二齿小蠹的分类地位、分布、寄主和形态学特征等, 并研究了该虫的 DNA 条形码检测方法, 以期为口岸检疫鉴定提供参考。

## 1 名称与分类地位

学名: *Ips sexdentatus* (Boerner, 1767)。

异名: *Bostrichus pinastri* Bechstein, 1818; *Bostrichus sexdentatus* (Boerner, 1776); *Bostrichus stenographus* Duftschmidt, 1825; *Bostrycus pinastri* Bechstein; *Dermestes sexdentatus* Borner; *Dermestes sexdentatus* Borner, 1776; *Ips sexdentatus junnanicus* Sokanovskii, 1959; *Ips stenographus* (Duftschmidt, 1825); *Tomicus sexdentatus* (Boerner, 1776); *Tomicus stenographus* (Duftschmidt, 1825); *Tomicus stenographus* Duftschmidt。

中文名: 十二齿小蠹、松十二齿小蠹。

分类地位: 鞘翅目 Coleoptera, 小蠹科 Scolytidae, 齿小蠹亚科 Ipinae, 齿小蠹族 (Ipini), 齿小蠹属 *Ips* De Geer<sup>[1]</sup>。

## 2 分布

国外主要分布于俄罗斯 (远东及西伯利亚)、白俄罗斯、比利时、土耳其、乌克兰、南斯拉夫、瑞典、瑞士、塞尔维亚和黑山、斯洛伐克、斯洛文尼亚、爱沙尼亚、奥地利、保加利亚、波兰、德国、法国、芬兰、荷兰、捷克、克罗地亚、拉脱维亚、立陶宛、卢森堡、罗马尼亚、马其顿、摩尔多瓦、挪威、葡萄牙、西班牙、希腊、匈牙利、意大利、英国、阿塞拜疆、格鲁吉亚、美

国、朝鲜、韩国、蒙古、缅甸、日本、泰国、亚美尼亚<sup>[3-5]</sup>。

国内原发生于黑龙江林区, 目前在吉林、辽宁、新疆、内蒙古、陕西、四川、云南等地均有分布<sup>[6]</sup>。

## 3 寄主与危害

寄主主要为针叶树, 如高加索冷杉 (*Abies nordmanniana*)、云杉 (*Picea asperata*)、欧洲云杉 (*Picea excelsa*)、鱼鳞云杉 (*Picea jezoensis* var. *microsperma*)、红皮云杉 (*Picea koraiensis*)、东方云杉 (*Picea orientalis*)、落叶松 (*Larix gmelinii*)、华山松 (*Pinus armandii*)、高山松 (*Pinus densata*)、思茅松 (*Pinus kesiya* var. *langbianensis*)、红松 (*Pinus koraiensis*)、欧洲白皮松 (*Pinus leucodermis*)、黑松 (*Pinus nigra*)、海岸松 (*Pinus pinaster*)、意大利伞松 (*Pinus pinea*)、辐射松 (*Pinus radiata*)、西伯利亚五针松 (*Pinus sibirica*)、欧洲赤松 (*Pinus sylvestris*)、樟子松 (*Pinussylvestris* var. *mongolica*)、油松 (*Pinus tabulaeformis*)、油松 (*Pinus tabuliformis*)、黄山松 (*Pinus taiwanensis*)、云南松 (*Pinus yunnanensis*) 等<sup>[3-4]</sup>。

主要危害风倒木、火烧木、衰老、生长势差的衰弱木, 是次期性害虫的先锋军<sup>[1-2]</sup>。陈辉等<sup>[7]</sup>研究表明, 十二齿小蠹是秦岭华山松的主要次期性小蠹, 能迅速入侵衰弱的寄主华山松, 利用寄主树木树干基部的营养空间。危害严重时能直接攻击健康的活立木, 曾在法国中部、西班牙和葡萄牙引起遭受干旱影响的欧洲赤松死亡, 并在土耳其的东方云杉上暴发危害<sup>[4]</sup>。十二齿小蠹危害的坑道状见图 1。

## 4 形态特征

雌雄成虫形态、大小相似, 体长 5.8~7.5 mm, 褐色至黑褐色, 头部、斜面及侧面体被长细毛<sup>[3]</sup>。触角膝状, 锤状部膨大明显; 复眼完整, 呈肾形; 额面有一横向隆堤, 凸起在两眼之间, 堤基宽厚, 堤顶狭窄光亮, 呈一字形, 横堤与口上片之间有中隆线与横堤连成“丁”字。下部刻点细而密, 上部刻点粗大疏散。前胸背板无侧缘, 正面前看圆后方, 呈盾形, 长约

**作者简介** 胡淑青 (1992—), 女, 广东广州人, 助理工程师, 从事植物检疫及生物技术研究。\* 通信作者, 农艺师, 硕士, 从事植物检疫及分子生物学研究。

**收稿日期** 2021-04-27

是宽的1.1倍,全部背板以纵中线为轴,左右对称,瘤区和刻点区各占背板长度的一半,瘤区中的颗粒瘤低平微弱,后部颗粒瘤扁平,形如鳞片。鞘翅长为前胸背板的1.5倍,为两翅合宽

的1.6倍,沟间部无点无毛;鞘翅斜面每侧缘上隆起6个齿,前3齿基阔顶尖,呈锥形,其中第2、3两齿略大,第1齿稍小,第4齿粗壮挺拔最大,尖端呈纽扣状(图2)<sup>[4]</sup>。



图1 十二齿小蠹危害的坑道状

Fig.1 Tunnel shape damage caused by *Ips sexdentatus*



注:A.背面观;B.侧面观;C.腹面观;D.头部正面观;E.鞘翅斜面观;F.尾部腹面观

Note: A. Back view; B. Side view; C. Ventral view; D. Front view of head; E. Oblique view of elytra; F. Ventral view of tail

图2 十二齿小蠹成虫形态特征

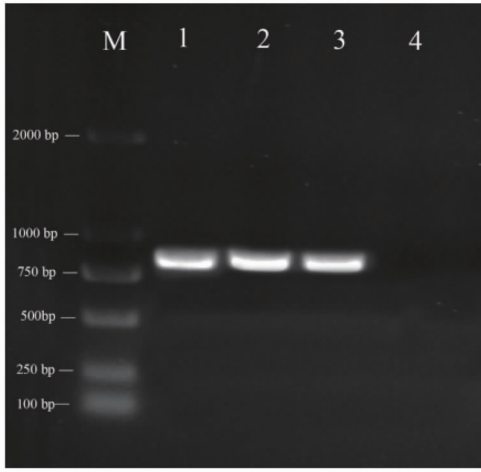
Fig.2 Morphological characteristics of adults of *Ips sexdentatus*

## 5 DNA条形码分子检测方法

**5.1 DNA提取、PCR扩增及序列分析** 取3头成虫样品分别用于DNA提取,分3个反应同时进行,提取方法参照Qiagen公司基因组DNA提取试剂盒说明书(DNeasy Blood & Tissue Kit Cat No./ID:69504)。采用从GenBank数据库下载的十二齿小蠹COI基因序列(AF113380.1、KP314288.1)设计的特异性引物 *Ips sex*\_11: 5'-AGATTCTGATTACTTCCACCCT-3' 和 *Ips sex*\_12: 5'-GAGAACTAAGCCAAATCCTG-3'。PCR反应条件:94℃预变性4 min;94℃变性30 s,57℃退火

30 s,72℃延伸2 min,循环30次;72℃延伸10 min。PCR扩增产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳分析,将正确条带的PCR产物送上海生工(Sangon)进行正反双向测序。测序结果采用SeqMan软件进行序列校对和拼接,去除两端引物序列,获得长度为855 bp的COI条形码序列(图3)。

将序列在GenBank数据库中进行相似性比对分析,依据相似性的高低和形态近似种属,将十二齿小蠹、北海齿小蠹(*I. amitinus*)、波若混齿小蠹(*I. perroti*)、刺形齿小蠹(*I. spinifer*)、大体齿小蠹(*I. emarginatus*)、短喙齿小蠹(*I. avulsus*)、高



注: M. DL 2000 DNA Maker; 1~3. 十二齿小蠹 PCR 扩增电泳结果; 4. 阴性对照  
 Note: M. DL 2000 DNA Maker; 1~3. PCR amplification result of *Ips sexdentatus*; 4. Negative control

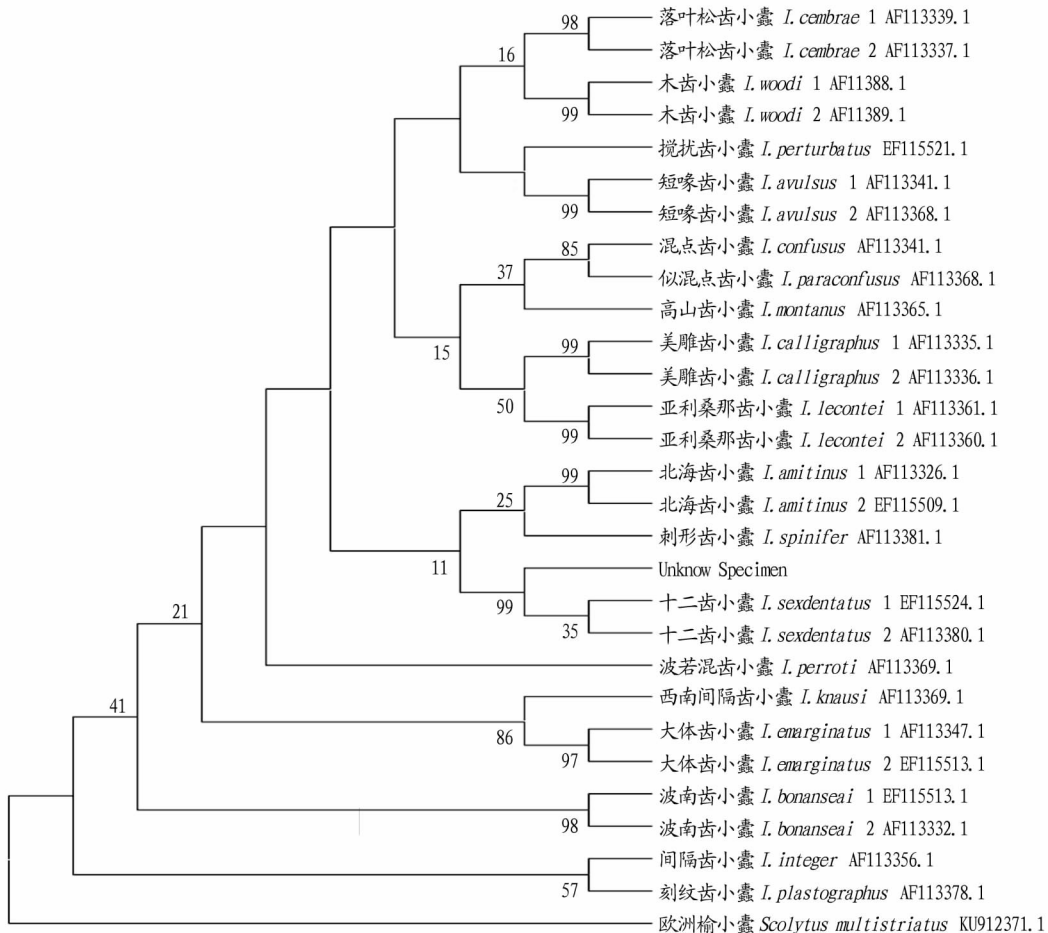
图 3 PCR 扩增电泳图

Fig.3 Electrophoretogram of PCR amplification

山齿小蠹 (*I. montanus*)、混点齿小蠹 (*I. confusus*)、间隔齿小蠹 (*I. integer*)、搅扰齿小蠹 (*I. perturbatus*)、刻纹齿小蠹 (*I. plas-*

*tographus*)、落叶松齿小蠹 (*I. cembrae*)、美雕齿小蠹 (*I. calligraphus*)、木齿小蠹 (*I. woodi*)、似混齿小蠹 (*I. paraconfusus*)、西南间隔齿小蠹 (*I. knausi*) 和亚利桑那齿小蠹 (*I. lecontei*) 18 种齿小蠹属 COI 序列片段下载保存。将所有序列用 Clustal X1.83 软件进行序列比对, 并转换成 FASTA 格式, 再利用 MEGA 6.0 软件计算各物种间的遗传距离, 并基于邻接法 (NJ) 构建系统发育树。系统发育树各分支置信区间 (bootstrap) 均进行 1 000 次重复检验, 以此确定待鉴定昆虫种类。

**5.2 结果分析** 通过 Clustal X1.83 软件比对分析上述所得的 COI 序列, 发现 3 头测试样品的序列完全一致。将 COI 序列上传至 GenBank 中进行“Blastn”相似性检索, 结果发现该序列与序列号为 KX035215.1 十二齿小蠹线粒体基因序列相似度达 99%, 覆盖率达 97%; 与 AF113380.1 的十二齿小蠹 COI 序列相似度达 99%, 覆盖率达 89%。在 NCBI 上下载 15 种齿小蠹属 COI 基因序列, 并以欧洲榆小蠹 (*Scolytus multistriatus* (KU91237.1)) 为外群, 应用 MEGA 6.0 软件构建系统发育树, 发现待测鉴定昆虫与十二齿小蠹聚为同一分支, 其置信度为 99%, 且与其他齿小蠹属明显分开 (图 4)。GenBank 比对结果、构建的系统发育树与形态学分类结果都一致, 因此可以判定待鉴定昆虫为十二齿小蠹。所得的 COI 序列已



注: Unknow Specimen 为待测昆虫  
 Note: Unknown Specimen referred to the insect to be tested

图 4 基于邻接法 (NJ) 构建的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree constructed by the Neighbor-Joining Algorithm (NJ)



上传至 GenBank 数据库,序列登记号为 MH260900。

## 6 讨论

小蠹科是重要的森林蛀干害虫之一,其成虫和幼虫蛀食树皮或木质部,危害极其隐蔽,被认为是通过国际贸易传播最为普遍的一类昆虫,也是口岸截获最为普遍的类群之一。我国口岸截获小蠹的分类鉴定主要是依靠传统的形态学分类技术,然而小蠹个体较小,有许多近似种之间形态特征差异甚微,因此,鉴定人员应当具备较高的昆虫分类知识水平和显微镜操作技术。此外,口岸截获的小蠹虫很大部分为幼虫,难于在实验室条件下饲养成成虫,仅依靠幼虫的特征来判定该虫种类非常困难,这进一步加大口岸对截获小蠹虫分类鉴定的难度。

近年来,昆虫 DNA 条形码技术已广泛应用于种类分子鉴定,成为昆虫分类形态鉴定的重要补充手段。目前,DNA 条形码技术已在鳞翅目<sup>[8]</sup>、半翅目<sup>[9]</sup>、双翅目<sup>[10-11]</sup>、膜翅目<sup>[12]</sup>、鞘翅目<sup>[13]</sup>、蜉蝣目<sup>[14]</sup>、弹尾目<sup>[15]</sup>、直翅目<sup>[16-17]</sup>和蜻蜓目<sup>[18]</sup>等中被证实可以进行物种分类鉴定。此外,Greenstone 等<sup>[19]</sup>通过对步甲科 Carabidae 的卵、幼虫、蛹与成虫 COI 序列比较研究,认为可以对未成熟步甲进行种间鉴定;Mitchell 等<sup>[20]</sup>结合 DNA 条形码技术和形态学分类,成功对澳大利亚坚果植物上的外侵害虫小蠹虫亚科的不成熟阶段进行分类研究,显示了 DNA 条形码技术在昆虫卵、幼虫鉴定时具有的优越性。常虹等<sup>[21]</sup>采用小蠹科通用引物和小蠹科 COI 序列设计引物进行巢式 PCR,获得包括十二齿小蠹在内的 11 种齿小蠹属的 COI 序列。该研究在形态学特征的基础上,结合 DNA 条形码技术,设计 1 对特异性 COI 引物获得 COI 序列,成功鉴定了待鉴定昆虫,此方法更为简单、快速、准确。

目前,十二齿小蠹并未被列为我国重点关注的检疫性有害生物名录,但该虫仅在我国几个省区有分布,且该虫是全国口岸截获频率较高的小蠹种类之一,据动植物检疫信息共享服务平台统计全国口岸于 2010—2021 年共截获 181 次,分别从乌克兰、阿根廷、加蓬、法国、立陶宛、美国、德国、菲律宾、加拿大、爱沙尼亚、澳大利亚和英国等国家截获。其成虫、幼虫均可造成危害,且寄主是我国常见松属、云杉属植物等针叶树,分布遍及全国,因此该虫极易在我国找到适宜的生活环境,对我国林业造成严重威胁。因此,建议各监管部门应加强对该虫的检疫力度,研究针对该虫的检疫处理措施,防止其进一步扩散。

## 参考文献

- [1] 萧刚柔.中国森林昆虫[M].2 版.北京:中国林业出版社,1992:625-626.
- [2] JACTEL H, LIEUTIER F. Effects of attack density on fecundity of the scots pine beetle *Ips sexdentatus* Boern (Col.; Scolytidae) [J]. Journal of applied entomology, 1987, 104(1/2/3/4/5): 190-204.
- [3] 陈乃中.中国进境植物检疫性有害生物(昆虫卷)[M].北京:中国农业出版社,2009:359-371.
- [4] 汪莹,林伟,徐浪,等.进口美国松木中截获齿小蠹的鉴定(鞘翅目:小蠹科)[J].应用昆虫学报,2016,53(6):1391-1400.
- [5] JEGER M, BRAGARD C, CAFFIER D, et al. Pest categorisation of *Ips sexdentatus* [J]. EFSA journal, 2017, 15(11): 1-28.
- [6] 舒朝然,詹敏.松十二齿小蠹的危险性分析[J].沈阳农业大学学报, 2005, 36(2): 175-179.
- [7] 陈辉,唐明,叶宏谋,等.秦岭华山松小蠹生态位研究[J].林业科学, 1999, 35(4): 40-44.
- [8] AUSTERLITZ F, DAVID O, SCHAEFFER B, et al. DNA barcode analysis: A comparison of phylogenetic and statistical classification methods [J]. BMC bioinformatics, 2009, 10(S14): 1-13.
- [9] PARK D S, FOOTITT R, MAW E, et al. Barcoding bugs: DNA-based identification of the true bugs (Insecta: Hemiptera: Heteroptera) [J]. PLoS One, 2011, 6(4): 1-9.
- [10] EKREM T, WILLASSEN E, STUR E. A comprehensive DNA sequence library is essential for identification with DNA barcodes [J]. Molecular phylogenetics and evolution, 2007, 43(2): 530-542.
- [11] 梁亮,江威,余慧,等.中国果实蝇属种类的 DNA 条形码鉴定(双翅目,实蝇科)[J].动物分类学报,2011,36(4): 925-932.
- [12] LI Y W, ZHOU X, FENG G, et al. COI and ITS2 sequences delimit species, reveal cryptic taxa and host specificity of fig-associated *Sycophila* (Hymenoptera, Eurytomidae) [J]. Molecular ecology resources, 2010, 10(1): 31-40.
- [13] 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.
- [14] BALL S L, HEBERT P D N, BURIAN S K, et al. Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes [J]. Journal of the North American benthological society, 2005, 24(3): 508-524.
- [15] 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.
- [16] YASSIN A, AMÉDÉGNATO C, CRUAUD C, et al. Molecular taxonomy and species delimitation in Andean *Schistocerca* (Orthoptera: Acrididae) [J]. Molecular phylogenetics & evolution, 2009, 53(2): 404-411.
- [17] 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.
- [18] RACH J, DESALLE R, SARKAR I N, et al. Character-based DNA barcoding allows discrimination of genera, species and populations in Odonata [J]. Proceedings of the royal society B, 2008, 275(1632): 237-247.
- [19] GREENSTONE M H, ROWLEY D L, HEIMBACH U, et al. Barcoding generalist predators by polymerase chain reaction: Carabids and spiders [J]. Molecular ecology, 2005, 14(10): 3247-3266.
- [20] MITCHELL A, MADDOX C. Bark beetles (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) of importance to the Australian macadamia industry: An integrative taxonomic approach to species diagnostics [J]. Australian journal of entomology, 2010, 49(2): 104-113.
- [21] 常虹,郝德君,肖荣堂,等.基于线粒体 COI 基因的齿小蠹属昆虫 DNA 条形码研究[J].昆虫学报,2012,55(9): 1075-1081.