



沟眶象线粒体基因组及象甲科系统发育分析

林兴雨 任凯杰 宋南

Analysis of the Mitochondrial Genome of *Eucryptorrhynchus Scrobiculatus* (Coleoptera: Curculionidae) and a Phylogenetic Analysis of Curculionidae

Lin Xingyu, Ren Kaijie, Song Nan

引用本文:

林兴雨, 任凯杰, 宋南. 沟眶象线粒体基因组及象甲科系统发育分析[J]. 西南林业大学学报, 2024, 44(3):182–190. doi: 10.11929/j.swfu.202305004

Lin Xingyu, Ren Kaijie, Song Nan. Analysis of the Mitochondrial Genome of *Eucryptorrhynchus Scrobiculatus*(Coleoptera: Curculionidae) and a Phylogenetic Analysis of Curculionidae[J]. *Journal of Southwest Forestry University(Natural Science)*, 2024, 44(3):182–190. doi: 10.11929/j.swfu.202305004

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11929/j.swfu.202305004>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

松瘤小蠹线粒体基因组测序及分析

Sequencing and Analysis of the Mitochondrial Genome of *Orthotomicus erosus*

西南林业大学学报. 2024, 44(1): 194–199 <https://doi.org/10.11929/j.swfu.202206033>

黄药大头茶叶绿体基因组密码子偏好性分析

Analysis of Codon Usage Bias in Chloroplast Genome of *Polyspora chrysandra*

西南林业大学学报. 2023, 43(5): 66–76 <https://doi.org/10.11929/j.swfu.202203018>

黄藤Dof家族的全基因组鉴定及系统进化分析

Genome-Wide Identification and Phylogenetic Analysis of the Dof Gene Family in *Daemonorops jenkinsiana*

西南林业大学学报. 2021, 41(6): 126–138 <https://doi.org/10.11929/j.swfu.202003051>

峨眉含笑叶绿体基因组密码子的使用模式分析

Analysis of Codon Usage Mode in Chloroplast Genome of *Michelia wilsonii*

西南林业大学学报. 2023, 43(4): 89–99 <https://doi.org/10.11929/j.swfu.202203037>

蒜头果叶绿体基因组密码子偏好性分析

Analysis of Codon Usage Bias in Chloroplast Genome of *Malania oleifera*

西南林业大学学报. 2021, 41(3): 15–22 <https://doi.org/10.11929/j.swfu.202001047>

星毛唐松草叶绿体基因组的测序及其密码子偏好性分析

Characteristics of *Thalictrum cirrhosum* Chloroplast Genome and Its Analysis on Codon Usage Bias

西南林业大学学报. 2023, 43(5): 47–56 <https://doi.org/10.11929/j.swfu.202205026>

DOI: 10.11929/j.swfu.202305004

引文格式: 林兴雨, 任凯杰, 宋南. 沟眶象线粒体基因组及象甲科系统发育分析 [J]. 西南林业大学学报 (自然科学), 2024, 44(3): 182–190.

沟眶象线粒体基因组及象甲科系统发育分析

林兴雨 任凯杰 宋南

(河南农业大学植物保护学院, 河南 郑州 450046)

摘要: 利用二代测序方法获得了沟眶象线粒体基因组序列, 并基于象甲科 29 个物种 (内群) 和叶甲科 3 个物种 (外群) 的 37 个线粒体基因核苷酸序列和 13 个蛋白质编码基因氨基酸序列, 通过最大似然法和贝叶斯法构建了象甲科的系统发育树。结果表明: 沟眶象的 13 个蛋白质编码基因只有 *nad1* 利用 TTG 作为起始密码子, 其余蛋白质编码基因的起始密码子都以 ATN 起始; 终止密码子除 *cox1* 和 *nad4* 以不完整的 T 结尾外, 其余蛋白质编码基因都是以 TAA 和 TAG 作为终止密码子; 除 *trnS1* 因缺少 DHU 臂而形成一个简单的环, 无法形成完整的三叶草形状, 剩下的 tRNA 基因均能形成完整的三叶草形状; *trnS1* 的反密码子不是常见的 GCU 而是 UCU。2 种系统发育分析产生相同的拓扑结构: 隐喙象亚科、龟象亚科、魔喙象亚科、小蠹亚科、粗喙象亚科和隐颞象亚科为单系群, 而象虫亚科为非单系群; 沟眶象与 *Trigonopterus carinirostris* + (*T. jasmineae* + *T. kotamobagensis*) 为姐妹群。本研究获得了沟眶象的线粒体基因组序列, 重建了象甲科的系统发育关系, 明确了沟眶象的系统发育位置, 有利于更加全面地理解象甲科系统发育关系和线粒体基因组学。

关键词: 鞘翅目; 象甲科; 沟眶象; 线粒体基因组; 系统发育

中图分类号: Q963

文献标志码: A

文章编号: 2095-1914(2024)03-0182-09

Analysis of the Mitochondrial Genome of *Eucryptorrhynchus Scrobiculatus* (Coleoptera: Curculionidae) and a Phylogenetic Analysis of Curculionidae

Lin Xingyu, Ren Kaijie, Song Nan

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

Abstract: The nearly complete mitochondrial genome of *Eucryptorrhynchus scrobiculatus* was sequenced by next-generation sequencing (NGS) method, and constructed the phylogenetic trees using Maximum Likelihood and Bayesian inference methods, based on the nucleotide sequences from mitochondrial genome of 37 genes and the amino acid sequences from thirteen protein-coding genes of 29 Curculionidae species (ingroup) and 3 Chrysomelidae species (outgroup). The findings revealed that most of protein-coding genes start with the codons of ATN except for the *nad1* genes. The latter one protein-coding genes use TTG as start codons. While *cox1* and *nad4* employ the incomplete T as the stop codon, the remaining nine protein-coding genes terminate with TAA or TAG.

收稿日期: 2023-05-05; 修回日期: 2023-05-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (U1904104) 资助。

第 1 作者: 林兴雨 (1999—), 男, 硕士研究生。研究方向: 基于基因组的昆虫系统发生。Email: xingyulin666666@163.com。

通信作者: 宋南 (1980—), 男, 博士, 副教授。研究方向: 基于基因组的昆虫系统发生。Email: songnan@henau.edu.cn。

All tRNA genes can be folded into typical cloverleaf structure, with the except of the *trnSI-AGN*. Both phylogenetic inference methods produced a similar tree topological structure: the subfamilie Cryptorhynchinae, Ceutorhynchina, Molytinae, Scolytinae, Entiminae and Dryophthorinae were monophyletic. However the subfamilies Curculioninae were non-monophyletic. The *E. scrobiculatus* is sister to *Trigonopterus carinirostris* + (*T. jasmineae* + *T. kotamobagensis*). In this paper, we obtained the complete mitochondrial genome sequence of the *E. scrobiculatus*, reconstructed the phylogeny of the Curculionidae family, and clarified the phylogenetic position of the *E. scrobiculatus*, which is beneficial to a more comprehensive understanding of the phylogeny and mitochondrial genomics of the Curculionidae family.

Key words: Coleoptera; Curculionidae; *Eucryptorrhynchus scrobiculatus*; mitochondrial genome; phylogeny

沟眶象（*Eucryptorrhynchus scrobiculatus*）为鞘翅目象甲科（Curculionidae），是臭椿等树上危害较为严重的蛀干害虫，广泛分布于我国北京、河南、河北、陕西和江苏等地。象甲科是鞘翅目象甲总科中数量最多的 1 个科，约 83 000 多个种，世界各地均有分布^[1-2]。象甲科幼虫通常为白色，体长在 2 ~ 70 mm 不等；成虫因具有长长的口器和一对膝状触角而容易被识别。象甲科昆虫分布区域较广，食性较杂，幼虫和成虫均能钻入植物的根、茎、叶、花和果实中蛀食危害，严重时可导致作物绝产，造成严重的经济损失，是农林业生产中重点关注的害虫之一^[3]。

线粒体基因组因组织结构相对保守常被应用于昆虫的分子进化、种群遗传以及系统发育等相关研究，通过运用二代测序技术，线粒体基因组可以很快被获得^[4]。最近的许多研究已经证明使用线粒体基因组数据可以在不同分类水平上解析

鞘翅目昆虫的系统发育关系^[5-9]，但通过线粒体基因组对象甲科昆虫系统发育分析的报道较少，主要有张峰等^[10]基于象甲科 13 个物种的线粒体基因组中的 13 个蛋白质编码基因的核苷酸矩阵和基于氨基酸矩阵构建象甲科的系统发育；陈英等^[11]基于象甲科的 39 个物种线粒体基因组的蛋白质编码基因的核苷酸序列矩阵和基于氨基酸矩阵构建象甲科的系统发育关系。

本研究利用二代测序技术测序、组装得到了沟眶象的线粒体基因组数据，并结合已公布线粒体基因组的象甲科 28 个昆虫作为内群，3 个叶甲科昆虫作为外群（表 1），构建 2 个数据矩阵（PCGRNA 和 PCGaa），利用最大似然法（ML）和贝叶斯法（BI）构建象甲科的系统发育关系，明确沟眶象的系统发育位置，以期为更好地理解象甲科和沟眶象的系统发育提供线粒体基因组数据。

表 1 构建系统进化树的物种样本信息
Table 1 Species sample information used in the phylogenetic tree construction in this study

科	亚科	种名	基因组数据库编号	长度/bp
象甲科 Curculionidae	龟象亚科 Ceutorhynchinae	油菜豆荚象虫 <i>Ceutorhynchus obstrictus</i>	MN180050	20124
		隐喙象亚科 Cryptorhynchinae		
	沟眶象 <i>Eucryptorrhynchus scrobiculatus</i>		OM744396	17436
		<i>Trigonopterus carinirostris</i>	MT653608	21007
		<i>Trigonopterus jasmineae</i>	MT653603	17417
		<i>Trigonopterus kotamobagensis</i>	MT653609	18038
	象虫亚科 Curculioninae	胡椒花象 <i>Anthonomus eugenii</i>	MK654676	17257
		梨花象 <i>Anthonomus pomorum</i>	MK654677	17093
		<i>Anthonomus rectirostris</i>	MK654678	17676
		<i>Anthonomus rubi</i>	MK654679	17476

续表 1

科	亚科	种名	基因组数据库编号	长度/bp
鞘翅目	隐颊象亚科 Dryophthorinae	欧洲栗象 <i>Curculio elephas</i>	KX087269	17591
		<i>Elaeiodobius kamerunicus</i>	MT560591	17729
		松瘤象甲 <i>Sipalinus gigas</i>	MT809476	17120
	粗喙象亚科 Entiminae	米象 <i>Sitophilus oryzae</i>	KX373615	17602
		玉米象 <i>Sitophilus zeamais</i>	MT294139	18531
		茶丽纹象甲 <i>Myllocerinus aurolineatus</i>	MH197100	17762
	魔喙象亚科 Molytinae	<i>Sitona obsoletus</i>	MH814932	17003
		筛孔二节象 <i>Aclees cribratus</i>	MZ305480	17435
		<i>Aclees taiwanensis</i>	MZ305480	17435
	小蠹亚科 Scolytinae	板栗雪片象 <i>Niphades castanea</i>	MT232762	17494
		<i>Pantoxystus rubricollis</i>	KX087330	17997
		肾点毛小蠹 <i>Dryocoetes autographus</i>	KX035207	17055
		<i>Hylastes attenuatus</i>	KX035212	17409
		六齿小蠹 <i>Ips acuminatus</i>	MK988441	19580
		<i>Ips calligraphus</i>	MW589547	19144
		<i>Orthotomicus laricis</i>	KX035213	18887
		罗汉肤小蠹 <i>Phloeosinus perlatus</i>	MW447510	17054
		<i>Pityogenes bidentatus</i>	KX035211	18781
		<i>Pityophthorus pubescens</i>	KX035209	17316
		<i>Trypophloeus asperatus</i>	KX035204	17039
	外群	<i>Acanthoscelides obtectus</i>	MF925724	26613
		<i>Callosobruchus analis</i>	KY856745	24832
		<i>Callosobruchus chinensis</i>	KY856744	24496

1 材料与方法

1.1 标本采集和 DNA 提取

供试沟眶象幼虫标本于 2020 年 6 月采集自河南省郑州市，将标本浸泡在 95% 的乙醇溶液中，置于-80 ℃超低温冰箱保存，用于 DNA 提取。使用基因组试剂盒（天根生化科技有限公司，中国）提取沟眶象的 DNA，使用 NanoDrop 2000 分光光度计（赛默飞，美国）检测 DNA 的质量，使用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的浓度。

1.2 二代测序与线粒体基因组组装

将大于 10 ng/μL 的质量合格的 DNA 送往上海派森诺生物科技有限公司进行二代测序，利用全基因组鸟枪法（WGS）进行小片段文库的构建，使用 Illumina HiSeq 2500 测序平台对构建的

文库进行双末端（2 × 150 bp PE）测序，获得约 2Gb 的原始数据，将原始数据进行质量控制，通过 Geneious v 11.1.15^[12] 软件以沟眶象的 *cox1* 基因作为参考，数据进行组装和拼接后，获得沟眶象的线粒体基因组的序列。

1.3 线粒体基因组的注释和分析

利用沟眶象的线粒体基因组数据在 MITOS^[13] 网站上进行线粒体基因组注释，选用无脊椎动物参数进行设置。通过比对其他象甲科物种的线粒体基因组序列，手动矫正 13 个蛋白质编码基因（*cox1*、*cox2*、*cox3*、*cytb*、*atp6*、*atp8*、*nad1*、*nad2*、*nad3*、*nad4*、*nad4l*、*nad5* 和 *nad6*）、转运 RNA 基因、16S 和 12S 核糖体基因的基因边界（表 2）。将正确的线粒体基因组序列上传至 GenBank（序列号：OM744396）。运用 MEGA 7.0^[14] 软件计算沟眶象线粒体基因组核苷酸组成以及密码子的使用。利用 AT-skew = (A - T) / (A +

T) 和 $GC-skew = (G - C) / (G + C)$ 法则分别计算 AT 偏倚和 GC 偏倚。

表 2 沟眶象线粒体基因组注释
Table 2 Annotation of the mitochondrial genome of *E. scrobiculatus*

基因	基因长度/ bp	起始位置/ bp	终止位置/ bp	起始 密码子	终止 密码子	编码链
<i>trnI</i>	65	1	65			H
<i>trnQ</i>	68	854	787			L
<i>trnM</i>	70	874	943			H
<i>nad2</i>	1 011	944	1954	ATT	TAA	H
<i>trnW</i>	70	1954	2023			H
<i>trnC</i>	68	2 105	2038			L
<i>trnY</i>	63	2 194	2 132			L
<i>cox1</i>	1 540	2 187	3 726	ATT	T	H
<i>trnL2</i>	65	3 727	3 791			H
<i>cox2</i>	684	3 792	4 475	ATT	TAA	H
<i>trnK</i>	72	4 478	4 549			H
<i>trnD</i>	64	4 549	4 612			H
<i>atp8</i>	156	4 613	4 768	ATT	TAA	H
<i>atp6</i>	675	4 762	5 436	ATG	TAA	H
<i>cox3</i>	783	5 436	6 218	ATG	TAA	H
<i>trnG</i>	65	6 223	6 287			H
<i>nad3</i>	354	6 288	6 641	ATT	TAA	H
<i>trnA</i>	68	6 645	6 712			H
<i>trnR</i>	66	6 712	6 777			H
<i>trnN</i>	64	6 776	6 839			H
<i>trnS1</i>	67	6 840	6 906			H
<i>trnE</i>	64	6 906	6 969			H
<i>trnF</i>	66	7 041	6 976			L
<i>nad5</i>	1 725	8 765	7 041	ATT	TAA	L
<i>trnH</i>	66	8 831	8 766			L
<i>nad4</i>	1 330	10 161	8 832	ATA	T	L
<i>nad4l</i>	294	10 451	10 158	ATG	TAA	L
<i>trnT</i>	65	10 457	10 521			H
<i>trnP</i>	64	10 585	10 522			L
<i>nad6</i>	507	10 588	11 094	ATT	TAA	H
<i>Cob</i>	1 140	11 095	12 234	ATG	TAA	H
<i>trnS2</i>	68	12 234	12 301			H
<i>nad1</i>	951	13 322	12 372	TTG	TAG	L
<i>trnL1</i>	66	13 389	13 324			L
<i>rrnL</i>	824	14 221	13 398			L
<i>trnV</i>	66	14 290	14 225			L
<i>rrnS</i>	782	15 557	14 776			L
控制区	1 879	15 558	17 436			非编码序列

注: H表示正链; L表示负链; T 表示不完全密码子。

1.4 多序列比对

利用 MAFFT 软件对 37 个基因的核苷酸序列和蛋白质编码基因的氨基酸序列分别进行多序列

比对^[15], 使用 trimAl v1.4 对质量差的序列进行去除和对齐^[16], 运用 FASconCAT-G_v1.04 对数据进行分别串联获得数据矩阵^[17]。用于系统发育分析的数据矩阵包括: 1) 线粒体基因组的 37 个基因序列构建的数据矩阵 (PCGRNA) 用于最大似然法分析; 2) 13 个蛋白质编码基因的氨基酸序列构建的数据矩阵 (PCG_aa) 用于贝叶斯法分析。

1.5 系统发育分析

利用最大似然法和贝叶斯法 2 种系统发育分析方法构建象甲科的系统发育关系。利用 IQ-TREE 2.0.6^[18] 进行最大似然法分析: 自动筛选 GTR + F + I + G4 为系统发育树最优模型, 系统发育树的节点支持率通过自举检验置信度进行评估 (运行次数设置为 10 000)。使用 MrBayes v 3.2 进行贝叶斯法分析^[19]。使用四条蒙特卡罗马尔柯夫链 (MCMC) 进行运算, 并同时运行 2×10^6 代, 每 1 000 代抽样一次, 丢弃 25%, 构建多数一致树。

2 结果与分析

2.1 线粒体基因组分析

沟眶象的线粒体基因组结构利用 OGDRAW^[20] 进行绘制 (图 1)。沟眶象的线粒体基因组全长为 17 436 bp, A + T 含量为 77.6%, G + C 含量为 22.4%, 具有丰富的 AT 含量值, 其线粒体基因组包含 37 个基因和 1 段控制区, 其中控制区位于 *rrnS* 和 *trnI* 之间, 长度为 1 879 bp。沟眶象的蛋白质编码基因、rRNA 和 tRNA 的 AT 含量在 75.2% ~ 81%, 具有丰富的 AT 含量值。AT 偏倚和 GC 偏倚在 -0.194 ~ 0.035 和 -0.195 ~ 0.42 (表 3)。

2.2 蛋白质编码基因分析

沟眶象线粒体基因组的 13 个蛋白质编码基因中 A + T 含量为 76.3%, G + C 含量为 23.7%。位于正链的蛋白质编码基因长为 6 849 bp, A + T 含量为 75.2%, G + C 含量为 24.8%, AT 偏倚为 -0.1, GC 偏倚为 -0.195。位于负链的蛋白质编码基因长为 4 299 bp, A + T 含量为 78.9%, G + C 含量为 21.1%, AT 偏倚为 -0.194, GC 偏倚为 0.24。

13 个蛋白质编码基因的起始密码子中, 仅有 *nad1* 利用 TTG 作为起始密码子, 剩下的 12 个蛋白质编码基因都是以典型的 ATN 密码子开头。终止密码子除 *cox1* 和 *nad4* 以不完整的 T 结尾外, 其余蛋白质编码基因都是以 TAA 和 TAG 结尾。在所有蛋白质编码基因的氨基酸使用中, 苏氨酸

(Thr)、丙氨酸 (Ala)、半胱氨酸 (Cys)、甘氨酸 (Gly) 有较高的使用频率, 平均使用比例为 43.649%、32.650%、12.335%、11.355%。精氨酸的使用比例较低, 仅为 0.009%。此外, 沟眶象线粒体基因组的密码子使用中, UUA 密码子使用次数最多 (373 次), 详见表 4。

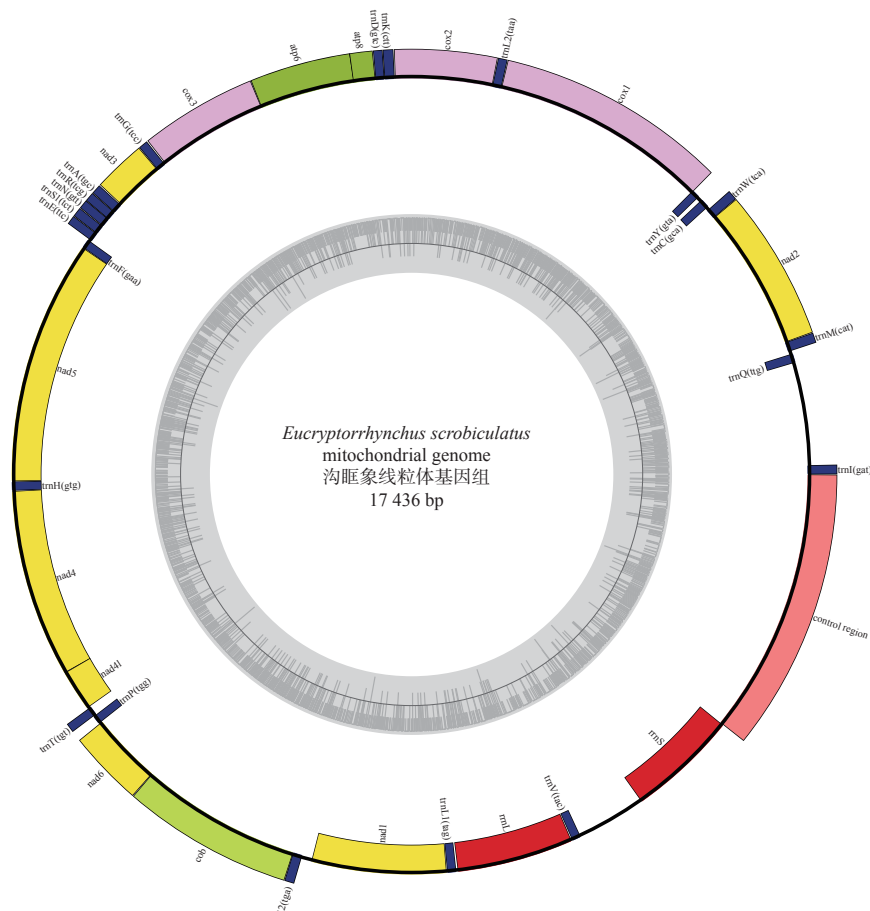


图 1 沟眶象线粒体基因组结构
Fig. 1 Structure of the *E. scrobiculatus* mitochondrial genome

表 3 沟眶象线粒体基因组的核苷酸组成和偏倚
Table 3 Nucleotide composition and skewness of the *E. scrobiculatus* mitochondrial genome

Feature 特征	长度/bp	AT/%	AT偏倚	GC偏倚
PCGs-H	6849	75.2	-0.100	-0.195
PCGs-L	4299	78.9	-0.194	0.240
rRNAs-L	1606	77.6	-0.002	0.313
tRNAs-H	933	77.8	0.030	-0.034
tRNAs-L	527	81.0	0.035	0.420

注: PCGs表示蛋白质编码基因; rRNAs表示核糖体RNA; tRNAs表示转运RNA; H表示重链; L表示轻链。

2.3 tRNA 和 rRNA 基因分析

沟眶象线粒体基因组的 22 个 tRNA 基因的序列长度为 63 ~ 72 bp, 其中 *trnY* 基因最短为 63 bp, *trnK* 基因最长为 72 bp。22 个 tRNA 基因中,

14 个 tRNA 基因位于 H 链, 全长为 933 bp, A + T 含量为 77.8%, G + C 含量为 22.2%, AT 偏倚为 0.03, GC 偏倚为 -0.034。8 个 tRNA 基因位于 L 链, 全长为 527 bp, A + T 含量为 81%, G + C 含量为 19%, AT 偏倚为 0.035, GC 偏倚为 0.42。*rrnL* 基因位于 *trnL1* 基因和 *trnV* 基因之间, *rrnS* 基因位于 *trnV* 基因和 *trnI* 基因之间, *rrnL* 和 *rrnS* 基因位于 L 链。沟眶象线粒体基因组位于正负链的 tRNA 基因和 rRNA 基因均具有较丰富的 AT 含量值 (表 2)。除 *trnSI* 基因由于缺少二氢尿嘧啶臂而形成一个简单的环, 无法形成完整的三叶草形状, 其余 tRNA 基因均能形成完整的三叶草结构。此外, *trnSI* 的反密码子不是常见的 GCU 密码子, 而是密码子 UCU。

2.4 线粒体基因组的系统发育信号检测

本研究使用 DAMBE^[21] 软件对使用的 32 个物

种的线粒体基因组的核苷酸序列分别进行替代饱和度和检测，结果显示，这些线粒体基因组的核苷酸序列都没有出现碱基饱和。因此，可用于象甲科的系统发育树的构建，详细结果见表 5。

表 4 沟眶象线粒体基因组的相对密码子使用频率
Table 4 Relative synonymous codon usage of the mitochondrial genome of *E. scrobiculatus*

密码子	数量	RSCU	密码子	数量	RSCU	密码子	数量	RSCU	密码子	数量	RSCU
UUU(F)	301	1.8	UCU(S)	112	2.82	UAU(Y)	148	1.84	UGU(C)	24	2.00
UUC(F)	34	0.2	UCC(S)	7	0.18	UAC(Y)	13	0.16	UGC(C)	0	0
UUA(L)	373	4.22	UCA(S)	90	2.26	UAA(*)	0	0	UGA(W)	83	1.98
UUG(L)	25	0.28	UCG(S)	5	0.13	UAG(*)	0	0	UGG(W)	1	0.02
CUU(L)	77	0.87	CCU(P)	70	2.30	CAU(H)	58	1.66	CGU(R)	13	1.02
CUC(L)	14	0.16	CCC(P)	7	0.23	CAC(H)	12	0.34	CGC(R)	3	0.24
CUA(L)	36	0.41	CCA(P)	42	1.38	CAA(Q)	54	1.83	CGA(R)	33	2.59
CUG(L)	5	0.06	CCG(P)	3	0.10	CAG(Q)	5	0.17	CGG(R)	2	0.16
AUU(I)	321	1.81	ACU(T)	84	2.09	AAU(N)	152	1.84	AGU(S)	18	0.45
AUC(I)	34	0.19	ACC(T)	10	0.25	AAC(N)	13	0.16	AGC(S)	1	0.03
AUA(M)	208	1.88	ACA(T)	64	1.59	AAA(K)	104	1.82	AGA(S)	79	1.99
AUG(M)	13	0.12	ACG(T)	3	0.07	AAG(K)	10	0.18	AGG(S)	6	0.15
GUU(V)	52	1.45	GCU(A)	69	2.00	GAU(D)	49	1.81	GGU(G)	59	1.30
GUC(V)	6	0.17	GCC(A)	10	0.29	GAC(D)	5	0.19	GGC(G)	8	0.18
GUA(V)	77	2.15	GCA(A)	57	1.65	GAA(E)	70	1.77	GGA(G)	106	2.33
GUG(V)	8	0.22	GCG(A)	2	0.06	GAG(E)	9	0.23	GGG(G)	9	0.20

注：RSCU表示相对密码子使用频率；*表示终止密码子。

表 5 利用 DAMBE 检测 PCGs、tRNA 和 rRNA 序列的碱基替代饱和性
Table 5 Sequence saturation test of PCGs, tRNA and rRNA performed by DAMBE

	可操作分类单元数量	替代饱和指数	假设拓扑结构对称	概率	假设拓扑结构不对称	概率
32taxa-PCGs	32	0.417	0.817	0.000	0.571	0.000
32taxa-tRNA	32	0.392	0.775	0.000	0.493	0.000
32taxa-rRNA	32	0.441	0.788	0.000	0.517	0.000

2.5 系统发育分析

本研究选择叶甲科的 3 个昆虫（*Acanthoscelides obtectus*、*Callosobruchus analis* 和 *Callosobruchus chinensis*）作为外群，象甲科的 29 个昆虫作为内群的线粒体基因组的 PCGRNA 数据矩阵和 PCGaa 数据矩阵，分别使用最大似然法和贝叶斯法构建象甲科的系统发育关系。基于 2 种推断方法的系统发育分析结果见图 2~3。这 2 种矩阵构建的系统发育树的拓扑结构基本相同。2 种不同的系统发育分析一致支持隐喙象亚科 Cryptorhynchinae、龟象亚科 Ceutorhynchina、魔喙象亚

科 Molytinae、小蠹亚科 Scolytinae、粗喙象亚科 Entiminae 和隐颞象亚科 Dryophthorinae 为单系群，而象虫亚科 Curculioninae 为非单系群。在最大似然法分析中，龟象亚科与象虫亚科形成一枝，但具有相对低的节点支持值（BS=80）。然而，在贝叶斯法分析中，龟象亚科与魔喙象亚科同样出现较低的节点支持值，后验概率 PP=0.76。沟眶象的系统发育关系中，2 种系统发育分析结果都支持沟眶象与 *Trigonopterus carinirostris* + (*T. jasmineae* + *T. kotamobagensis*) 形成姐妹群关系，且具有较高的节点支持值（BS=100，PP=1）。

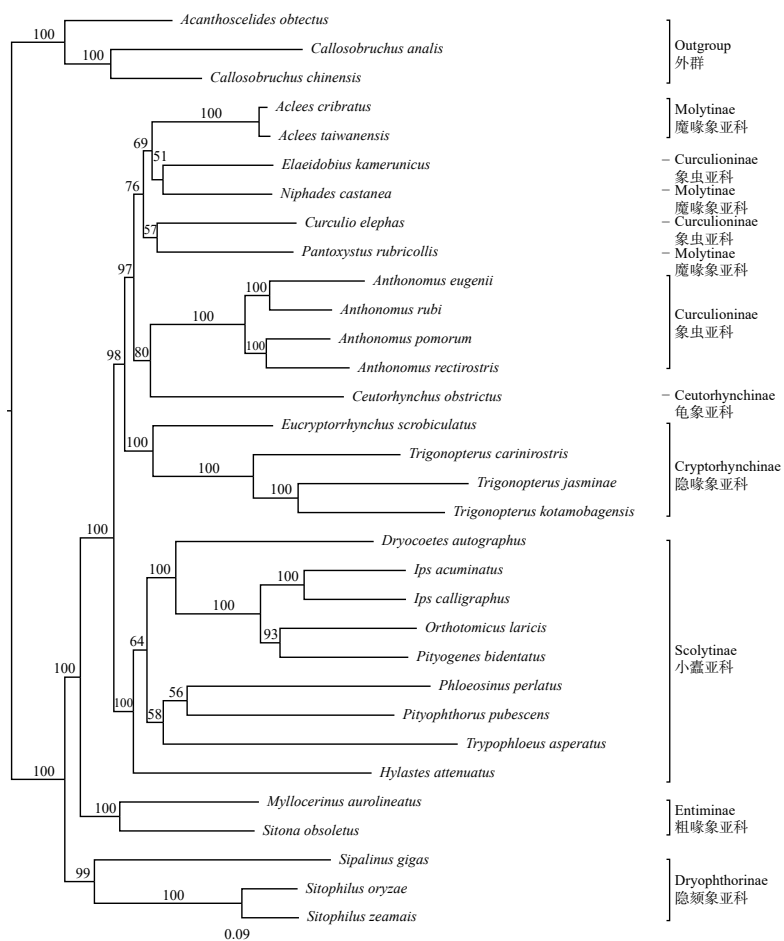


图 2 基于 37 个线粒体基因的核苷酸序列构建的最大似然树

Fig. 2 Maximum likelihood tree inferred from the nucleotide sequences of 37 mitochondrial genes

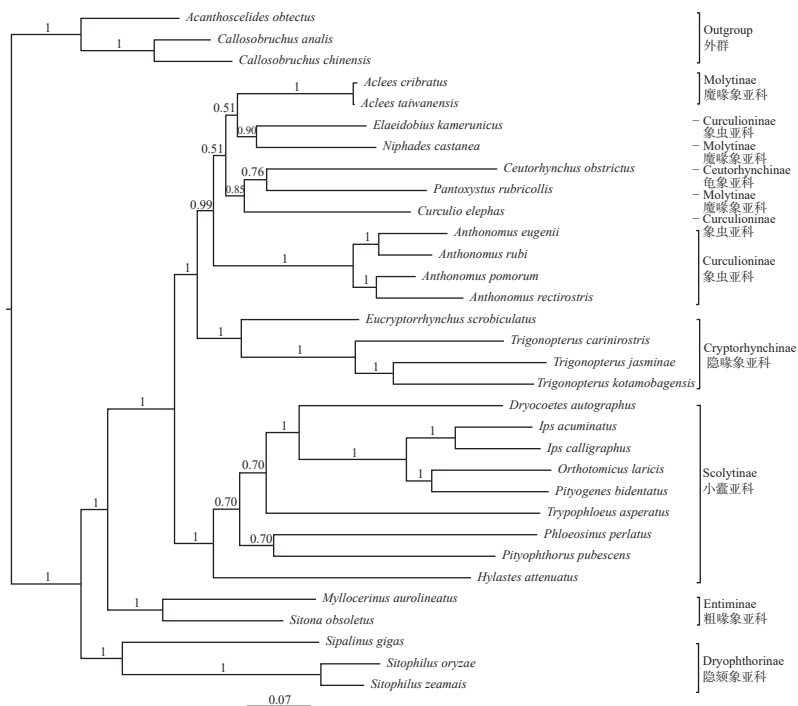


图 3 基于 13 个蛋白编码基因的氨基酸序列构建的贝叶斯树

Fig. 3 Bayesian tree inferred from the amino acid sequences of 13 protein-coding genes

3 结论与讨论

本研究测序获得的沟眶象线粒体基因组序列全长为 17436 bp, 共包含 13 个蛋白质编码基因, 22 个 tRNA 基因和 2 个 rRNA 基因。其线粒体基因组的基因排列顺序和假定同一祖先不同昆虫的线粒体基因组的排列顺序相同^[22]。沟眶象线粒体基因组中的 13 个蛋白质编码基因的起始密码子除 *nad1* 基因外, 都是典型的 ATN (即 ATT、ATA 和 ATG) 作为起始, 终止密码子除 *cox1* 和 *nad4* 以不完整的 T 结尾外, 其余蛋白质编码基因都是以 TAA 和 TAG 结尾。

13 个蛋白质编码基因的起始密码子只有 *nad1* 利用 TTG 作为起始, 其余 12 个蛋白质编码基因都是以典型的 ATN 密码子开头, 这种起始密码子使用现象在其他鞘翅目昆虫也出现过^[9]。终止密码子除 *cox1* 和 *nad4* 以不完整的 T 结尾外, 其余蛋白质编码基因都是以 TAA 和 TAG 结尾。这种不完整的终止密码进行结尾的现象通常被认为由 mRNA 转录后, 由起始端的碱基将终止密码子补充完整。

沟眶象线粒体基因组中的 22 个 tRNA 基因, 除 *trnS1* 因缺少 DHU 臂而形成一个简单的环, 无法形成完整的三叶草结构外, 其余 tRNAs 均能形成完整的三叶草结构, 这种现象在其他昆虫中也有出现^[23-24]。此外, *trnS1* 的反密码子不是常见的 GCU 而是 UCU, 这种情况被猜测可能是多食亚目的一个共源性状^[25]。

本研究以象甲科的 29 个物种作为内群, 叶甲科的 3 个物种作为外群, 结合已公布的 32 个物种的 13 个蛋白质编码基因的氨基酸序列构建矩阵, 利用贝叶斯法以及线粒体基因组的 37 个基因的核苷酸序列构建矩阵, 使用最大似然法构建系统发育树, 两个矩阵构建的系统发育树的结果均表明隐喙象亚科、龟象亚科、魔喙象亚科、小蠹亚科、粗喙象亚科和隐颞象亚科为单系群。这个结果与张峰等^[10]基于象甲科 13 个物种的线粒体基因组中的 13 个蛋白质编码基因的核苷酸序列和基于氨基酸利用最大似然法和贝叶斯法构建的系统发育树结果一致; 与陈英等^[11]基于象甲科 39 个物种线粒体基因组的蛋白质编码基因的核苷酸序列和基于氨基酸序列利用邻接法和最大似然法构建的系统发育树结果一致。

本研究中系统发育结果显示象虫亚科被恢复

为非单系群。在张峰等^[10]的研究中象虫亚科只有 1 个物种被用于象甲科的系统发育关系的研究, 因而对于象虫亚科的单系性仍然是不确定的; 陈英等^[11]用于象甲科系统发育关系的研究中, 只有象虫亚科 2 个物种被用于系统发育分析, 并且这 2 个物种为同一个属, 系统发育关系显示象虫亚科为单系群。本研究选取了目前已公布的所有象虫亚科物种包含 3 个属 6 个种的 37 个线粒体基因的核苷酸数据和 13 个蛋白质编码基因的氨基酸数据, 利用最大似然法和贝叶斯法的系统发育结果, 支持象虫亚科为非单系群。

本研究利用二代测序技术获得了沟眶象的线粒体基因组, 详细注释和分析了沟眶象的线粒体基因组的结构特点, 确定了沟眶象与 *T. carinirostris* + (*T. jasmineae* + *T. kotamobagensis*) 的姐妹群关系, 丰富了象甲科的线粒体基因组数据, 为后续象甲科的系统发育以及沟眶象的种群遗传学等研究提供了线粒体基因组数据。

[参 考 文 献]

- [1] Biedermann P H W, Nuotclà J A. Social beetles[M]//Encyclopedia of Social Insects. Cham: Springer International Publishing, 2020: 1-8.
- [2] Oberprieler R G, Marvaldi A E, Anderson R S. Weevils, weevils, weevils everywhere [J]. Zootaxa, 2007, 1668(1): 491-520.
- [3] Bandeira P T, Fávaro C F, Francke W, et al. Aggregation pheromones of weevils (Coleoptera: Curculionidae): advances in the identification and potential uses in semiochemical-based pest management strategies [J]. Journal of Chemical Ecology, 2021, 47(12): 968-986.
- [4] Straub S C K, Parks M, Weitemier K, et al. Navigating the tip of the genomic iceberg: next-generation sequencing for plant systematics [J]. American Journal of Botany, 2012, 99(2): 349-364.
- [5] Gillett C P D T, Crampton-Platt A, Timmermans M J T N, et al. Bulk *de novo* mitogenome assembly from pooled total DNA elucidates the phylogeny of weevils (Coleoptera: curculionoidea) [J]. Molecular Biology and Evolution, 2014, 31(8): 2223-2237.
- [6] Crampton-Platt A, Timmermans M J T N, Gimmel M L, et al. Soup to tree: the phylogeny of beetles inferred by mitochondrial metagenomics of a Bornean rainforest sample [J]. Molecular Biology and Evolution,

- 2015, 32(9): 2302–2316.
- [7] Timmermans M J T N, Barton C, Haran J, et al. Family-level sampling of mitochondrial genomes in Coleoptera: compositional heterogeneity and phylogenetics [J]. *Genome Biology and Evolution*, 2015, 8(1): 161–175.
- [8] Alejandro, López-López. The mitogenome phylogeny of adephaga (Coleoptera) [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2017, 114: 166–174.
- [9] 林兴雨, 翟卿, 宋南, 等. 锯谷盗线粒体基因组及扁甲总科系统发育分析 [J]. *河南农业大学学报*, 2023, 57(1): 109–117.
- [10] 张锋, 洪波, 王远征, 等. 枣食芽象甲线粒体基因组全序列测定与系统发育分析 [J]. *昆虫学报*, 2019, 62(11): 1305–1314.
- [11] 陈英, 罗朝兵, 李沅秋, 等. 象甲科线粒体基因组特征及系统发育分析 [J]. *环境昆虫学报*, 2019, 41(6): 1297–1310.
- [12] Kearse M, Moir R, Wilson A, et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data [J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(12): 1647–1649.
- [13] Bernt M, Donath A, Jühling F, et al. MITOS: improved *de novo* metazoan mitochondrial genome annotation [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2013, 69(2): 313–319.
- [14] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870–1874.
- [15] Katoh K, Standley D M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(4): 772–780.
- [16] Capella-Gutiérrez S, Silla-Martínez J M, Gabaldón T. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(15): 1972–1973.
- [17] Kück P, Longo G C. FASconCAT-G: extensive functions for multiple sequence alignment preparations concerning phylogenetic studies [J]. *Frontiers in Zoology*, 2014, 11(1): 1–8.
- [18] Nguyen L T, Schmidt H A, Von Haeseler A, et al. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2015, 32(1): 268–274.
- [19] Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space [J]. *Systematic Biology*, 2012, 61(3): 539–542.
- [20] Greiner S, Lehwark P, Bock R. OrganellarGenomeDRAW (OGDRAW) version 1.3. 1: expanded toolkit for the graphical visualization of organellar genomes [J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(W1): W59–W64.
- [21] Xia X, Xie Z. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution [J]. *Journal of Heredity*, 2001, 92(4): 371–373.
- [22] Boore J L. Animal mitochondrial genomes [J]. *Nucleic Acids Research*, 1999, 27(8): 1767–1780.
- [23] Shao L L, Huang D Y, Sun X Y, et al. Complete mitochondrial genome sequence of *Cheirotonus jansonii* (Coleoptera: Scarabaeidae) [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2014, 13(1): 1047–1058.
- [24] Li Z Y, Li X X, Song N, et al. The mitochondrial genome of *Amara aulica* (Coleoptera, Carabidae, harpalinae) and insights into the phylogeny of ground beetles [J]. *Genes*, 2020, 11(2): 181.
- [25] Sheffield N C, Song H, Cameron S L, et al. A comparative analysis of mitochondrial genomes in Coleoptera (Arthropoda: Insecta) and genome descriptions of six new beetles [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2008, 25(11): 2499–2509.

(责任编辑 刘永梅)

