

# 基于线粒体 CO I 基因序列的小萤叶甲属部分种类分子系统学研究

(鞘翅目:叶甲科:萤叶甲亚科)

郑福山, 杜予州\*, 王志杰, 王莉萍

(扬州大学应用昆虫研究所, 江苏扬州 225009)

**摘要:** 本文目的是通过对小萤叶甲属部分种类的线粒体 CO I 基因进行比较, 探讨小萤叶甲属昆虫进化与寄主植物之间的关系, 同时对几种分类地位模糊的昆虫进行分析和归类。测定了我国菱角萤叶甲 *Galerucella birmanica* Jacoby 和褐背小萤叶甲 *Galerucella griseescens* Joannis 以及小猿叶甲 *Phaedon brassicae* Baly 线粒体 CO I 基因 720 bp 序列, 并调用 GenBank 中小萤叶甲属等其他 8 种昆虫的同源序列, 对序列的碱基组成、转换颠换、遗传距离等进行了分析。并以小猿叶甲为外群, 分别采用邻接法(NJ)、最大简约法(MP)和贝叶斯推论法(BI)建立这些种的分子系统发育关系。序列分析结果表明:小萤叶甲属昆虫 CO I 基因 A+T 含量平均为 71.8%, 存在较强的 A+T 含量偏向性, 氨基酸的变异率为 18.3%;小萤叶甲属与外群之间的遗传距离(0.169~0.198)远远大于属内种间的距离(0.001~0.134)。依据分子系统树结果我们推测小萤叶甲属昆虫的进化与寄主植物之间有着显著的关系, 在传统分类学上曾隶属于其他属的几种昆虫与小萤叶甲昆虫有着更近的亲缘关系。

**关键词:** 叶甲科; 萤叶甲亚科; 小萤叶甲属; CO I 基因; 系统发育; 分子系统学

中图分类号: Q969 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2007)05-0501-07

## Molecular phylogeny of *Galerucella* spp. (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae) based on mitochondrial cytochrome oxidase I gene

ZHENG Fu-Shan, DU Yu-Zhou\*, WANG Zhi-Jie, WANG Li-Ping (Institute of Applied Entomology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

**Abstract:** The aim is to infer the phylogenetic relationships of *Galerucella* and outgroup *Phaedon brassicae* Baly beetle species (Coleoptera: Chrysomelidae) and to discuss the relation between the evolution of *Galerucella* and host plant. The sequences of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (CO I) gene were sequenced or downloaded from GenBank for the following species: *G. birmanica*, *G. nymphaeae*, *G. griseescens*, *G. suturalis*, *G. capreae*, *G. lineola*, *G. viburni*, *G. pusilla*, *G. calmariensis*, *G. tenella*, and outgroup *P. brassicae*. Nucleotides composition, transition and transversion, and genetic distance of a 720 bp segment were analyzed. By using Maximum Parsimony (MP), Neighbor-Joining (NJ) and Bayesian Inference (BI) methods, we constructed the molecular phylogeny of these species based on their CO I sequences. The results indicated that average A + T content of CO I gene in *Galerucella* was 71.8%, showing a strong A + T bias. The variation ratio of amino acid was 18.3%. Genetic distances between *Galerucella* and the outgroup *P. brassicae* (0.169–0.198) were bigger than those among *Galerucella* species (0.001–0.134). Molecular phylogenetic trees obtained suggested that there was remarkable relationship between the evolution of *Galerucella* and host plant, and *G. suturalis*, *G. capreae* and *G. viburni* have closer relationship with species of *Galerucella* than as defined in traditional taxonomy.

**Key words:** Chrysomelidae; Galerucinae; *Galerucella*; CO I gene; phylogeny; molecular systematics

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 973 资助项目(2006CB102002)

作者简介: 郑福山, 男, 1979 年生, 山东人, 博士研究生, 研究方向为昆虫分子系统学及种下分化, E-mail: zfs7993@163.com

\* 通讯作者 Author for correspondence, Tel.: 0514-7971854; E-mail: yzdu@yzu.edu.cn

收稿日期 Received: 2006-01-15; 接受日期 Accepted: 2007-04-11

随着分子生物学技术的发展,线粒体基因作为一种快速进化的分子标记,已成为研究生物进化的重要材料(Avise *et al.*, 1987, 1994; Moritz *et al.*, 1987; Harrison, 1989; Simon, 1991), mtDNA 序列的应用已成为许多系统学研究的标准(Caterino *et al.*, 2000), 在被广泛研究的线粒体基因中, CO I 也已经成为很多昆虫系统学研究的标准(Lunt *et al.*, 1996)。

小萤叶甲属 *Galerucella* 隶属于鞘翅目、叶甲科、萤叶甲亚科, 全世界已知 40 余种(Wilcox, 1971), 是一个较大的属, 其中很多种类为寡食性昆虫, 是很多恶性杂草的天敌, 因此, 该属昆虫具有十分重要的经济意义。目前, 对该属昆虫的研究主要集中在寄主专一性(Kaufman and Landis, 2000; Ding *et al.*, 2006; 林智慧等, 2006) 生物生态学(Tanaka and Nakasuji, 2002; McAvoy and Kok, 2004) 和天敌释放(Wiebe *et al.*, 2001) 等方面。但是, 在利用分子生物学技术进

行该属昆虫亲缘关系方面的研究报道甚少(Nokkala and Nokkala, 2004)。为此, 本文对小萤叶甲属 10 种昆虫的 CO I 基因序列进行比较分析, 利用分子数据建立 10 种昆虫的系统发育关系, 对小萤叶甲属昆虫的进化与寄主植物之间的关系进行了初步探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料来源

菱角萤叶甲、褐背小萤叶甲和小猿叶甲以及 GenBank 下载序列等样本信息见表 1。*G. suturalis*, *G. capreae* 和 *G. viburni* 在传统分类学上曾分别隶属于绿萤叶甲属 *Lochmaeata* 和毛萤叶甲属 *Phrrhalta* (Nokkala and Nokkala, 2004) 将其归类到小萤叶甲属。在采样过程中, 我们发现小猿叶甲和褐背小萤叶甲是同域物种, 且取食相同的蓼科植物, 因此, 选择小猿叶甲作为外群。

表 1 试虫采集信息及其 CO I 基因序列的 GenBank 登录号

Table 1 Collection data of samples and GenBank accession numbers of their CO I gene sequences

种名 Species	采集地点 Sampling location	采集时间 Sampling date	寄主 Host plant	GenBank 登录号 GenBank accession no.
菱角萤叶甲 <i>Galerucella birmanica</i>	江苏扬州 Yangzhou, Jiangsu	2005.08	菱科 Trapaceae	EF177824
睡莲小萤叶甲 <i>G. nymphaeae</i>	荷兰 Weerribben, Netherlands	-	睡莲科 Nymphaeaceae	AY247722*
褐背小萤叶甲 <i>G. griseocens</i>	江苏扬州 Yangzhou, Jiangsu	2005.08	蓼科 Polygonaceae	EF177825
<i>G. suturalis</i>	荷兰 Wageningen, Netherlands	-	蔷薇科 Rosaceae	AY247730*
<i>G. capreae</i>	荷兰 Wageningen, Netherlands	-	杨柳科 Salicaceae	AY247729*
<i>G. lineola</i>	荷兰 Weerribben, Netherlands	-	杨柳科 Salicaceae	AY247727*
<i>G. viburni</i>	荷兰 Nijmegen, Netherlands	-	杨柳科 Salicaceae	AY247731*
<i>G. pusilla</i>	荷兰 Hatert, Netherlands	-	千屈菜科 Lythraceae	AY247724*
<i>G. calvariensis</i>	荷兰 Nijmegen, Netherlands	-	千屈菜科 Lythraceae	AY247725*
<i>G. tenella</i>	荷兰 Hatert, Netherlands	-	蔷薇科 Rosaceae	AY247723*
小猿叶甲 <i>Phaedon brassicae</i>	江苏扬州 Yangzhou, Jiangsu	2005.08	蓼科 Polygonaceae	EF194893

\* 已发表序列 Published data (Nokkala and Nokkala, 2004)。

### 1.2 DNA 提取和测序方法

**1.2.1 DNA 提取及检测:** 将虫体置 1.5 mL EP 管, 加 200  $\mu$ L 无毒 CTAB 分离缓冲液研磨, 然后加 200  $\mu$ L 改良 2  $\times$  CTAB 分离缓冲液混匀, 再加 3  $\mu$ L 20 mg/mL Pro-K, 55 $^{\circ}$ C 保温 3 ~ 5 h, 13 000 r/min 离心 10 min, 取上清液加等体积的酚: 氯仿: 异戊醇抽提, 13 000 r/min 离心 5 min, 取上清液加入等体积冰冷的异丙醇并颠倒混合沉淀 DNA, -20 $^{\circ}$ C 冰箱沉淀过夜或 -70 $^{\circ}$ C 冰箱放置 1 ~ 2 h。然后 12 000 r/min 离心 20 min, 弃上清液, 70% 冰乙醇溶液清洗其沉淀, 10 000 r/min 离心 5 min, 将离心管倒置晾干后溶解于 20 ~ 30  $\mu$ L TE 溶液中, -20 $^{\circ}$ C 保存。DNA 检测采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测法 (Sambrook *et al.*, 1992)。

**1.2.2 PCR 扩增及产物检测:** 采用 Simon 等 (1994)

报道的 CO I 通用引物, 引物序列分别为: 1) 上游引物: C1-J-2183: 5'-CAACATTTATTTTGATTTTGG-3'; 2) 下游引物: TL2-N-3014: 5'-TCCAATGCACTAATCTGCCATATT-3'。扩增体系总体积为 50  $\mu$ L, 包括 10  $\times$  反应缓冲液 5  $\mu$ L, 25 mmol/L Mg<sup>2+</sup> 5  $\mu$ L, 10 mmol dNTP 1  $\mu$ L, 上游引物 1  $\mu$ L, 下游引物 1  $\mu$ L, DNA 模板 3  $\mu$ L 和 TaqDNA 聚合酶 2 U, 然后加 ddH<sub>2</sub>O 至终体积 50  $\mu$ L。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 50 $^{\circ}$ C 退火 60 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 120 s, 循环 35 次, 循环结束后在 72 $^{\circ}$ C 下延伸 10 min。扩增产物置 -20 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物电泳检测同上述 DNA 检测, 并用 DNAMark (DL2000) 标记扩增片断大小, 以便确定目的片段。

**1.2.3 PCR 产物纯化和测序:** PCR 产物委托上海

生工生物工程技术服务有限公司纯化、测序。测序仪为 ABI PRISM 3730 型,正反链双向测序旨在提高序列的精确度。

### 1.3 序列分析及系统发育重建

采用 ContigExpress 软件进行正反链序列拼接,将拼接好的序列保存为 FASTA 格式,然后在 NCBI 网站上进行序列同源性比较,采用 Clustal X1.83 软件(Chenna *et al.*, 2003)进行序列对准,并保存为 FASTA、PHYLIP 和 NEXUS 格式。比对结果采用 Mega3.0 软件(Kumar *et al.*, 2004)进行序列组成分析,基于 Kimura's two-parameter(Kimura, 1980)模型计算各分类单元之间的遗传距离及其标准差、序列碱基组成、保守位点、变异位点、简约信息位点、自裔位点、转换/颠换比值等。

在系统发育重建之前,首先对数据进行系统发育信号强弱的检测,以判断所得序列数据是否具有系统发育分析的信号及信号的强弱,本研究采用碱基替换饱和性分析方法进行信号检测。建树方法采用邻接法(NJ)(Sartou and Nei, 1987)、最大简约法(MP)(Kluge and Farris, 1969)和贝叶斯推论法,分别使用 MEGA 3.0、PHYLIP 3.66(Felsenstein, 2006)和 MrBayes 3.0(Huelsenbeck and Ronquist, 2001)软件进行系统发育重建。外群为叶甲亚科猿叶甲属的小猿

叶甲 *Phaedon brassicae* Baly。

## 2 结果与分析

### 2.1 mtDNA-CO I 基因序列组成和变异

采用 MEGA 3.0 软件对小萤叶甲属 10 种昆虫 CO I 基因序列进行分析,统计结果见表 2。720 个位点中没有插入/缺失现象,碱基差异数为 157,碱基组成上, A、T、C、G 的平均含量分别为 31.8%、39.8%、13.6%、14.8%。A + T 含量较高,为 71.6%,其中密码子第 1 位点 A + T 含量为 61.0%,第 2 位点为 62.5%,第 3 位点的 A + T 含量最高,达到 91.5%。第 3 位点 G 的含量最低,平均为 1.6%,A 的含量为最高,达到 46.6%,这表明密码子的碱基使用频率存在明显的偏向性,与典型的昆虫线粒体 DNA 碱基组成一致(Liu and Beckenbach, 1992; Simon *et al.*, 1994)。在氨基酸组成上,720 bp 的核苷酸序列共编码 240 个氨基酸,其中有 44 个发生了变异,变异率为 18.3%。氨基酸组成中,10 种小萤叶甲均不含半胱氨酸(Cys),由 19 种氨基酸组成,其中苯丙氨酸(Phe)、异亮氨酸(Ile)、丝氨酸(Ser)含量最高,反映出 CO I 基因在氨基酸组成上具有一定偏向性。

表 2 小萤叶甲属 10 种昆虫 CO I 基因序列组成统计表

Table 2 The content of CO I gene sequences of 10 species of *Galerucella*

	长度 Length (bp)	Cs	V	Pi	S	碱基含量 Nucleotide content (%)				
						T	C	A	G	A + T
全数据组(含外群)										
All CO I sites (including outgroup)	720	511	209	106	103	39.9	13.6	31.8	14.7	71.7
全数据组 All CO I sites	720	563	157	100	57	39.8	13.6	31.8	14.8	71.6
第 1 位点 CO I pos. 1	240	217	23	12	11	30.5	12.5	30.5	26.5	61.0
第 2 位点 CO I pos. 2	240	234	6	2	4	44.0	21.3	18.5	16.2	62.5
第 3 位点 CO I pos. 3	240	112	128	86	42	44.9	6.9	46.6	1.6	91.5

Cs:保守位点数 Conserved sites; V:变异位点数 Variable sites; Pi:简约信息位点 Parsimony informative sites; S:自裔位点 Singleton sites.

### 2.2 碱基替换分析

采用 MEGA 对 CO I 基因序列的替换数进行分析,结果表明,核苷酸替换主要发生在密码子第 3 位

点上(79.7%),且颠换高于转换, R 值为 0.8,表现出较为明显的替换饱和;而第 2 位点最为保守,且第 1、2 位点的转换高于颠换(表 3)。

表 3 小萤叶甲属 10 种昆虫 CO I 基因碱基替换统计表

Table 3 The nucleotide substitution of CO I gene of 10 species of *Galerucella*

	ii	si	sv	R	TT	TC	TA	TG	CC	CA	CG	AA	AG	GG
全数据组(含外群)														
All CO I sites (including outgroup)	649	33	38	0.9	259	12	17	1	83	3	0	207	4	100
全数据组 All CO I sites	659	30	31	0.9	262	11	15	1	84	3	0	211	2	102
第 1 位点 CO I pos. 1	232	7	1	6.1	70	3	0	0	27	0	0	72	0	63
第 2 位点 CO I pos. 2	238	1	1	1.1	105	0	0	0	51	0	0	44	0	38
第 3 位点 CO I pos. 3	188	22	30	0.8	87	9	14	0	6	2	0	95	2	0

ii:相同位点 Identical pairs; si:转换数 Transitional pairs; sv:颠换数 Transversional pairs; R:转换/颠换 Ts/Tv.

### 2.3 遗传距离分析

采用 MEGA 分析小萤叶甲属(包括外群)昆虫之间基于 Kimura-2 参数校正并采用 Bootstrap 重抽样 1 000 次进行检验(Felsenstein, 1985)的遗传距离,结

果见表 4。由表 4 可以看出,小萤叶甲属种间的遗传距离较小,介于 0.001 ~ 0.134 之间,与小猿叶甲之间的遗传距离最大,为 0.169 ~ 0.198。

表 4 小萤叶甲属 10 种昆虫 CO I 基因 Kimura-2 参数校正距离(下三角)和标准差(上三角)

Table 4 Kimura-2 parameter (lower triangle) and standard errors (upper triangle) of CO I gene of 10 species of *Galerucella*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1		0.004	0.005	0.010	0.012	0.012	0.012	0.010	0.011	0.011	0.015
2	0.011		0.006	0.010	0.012	0.011	0.012	0.011	0.011	0.011	0.015
3	0.018	0.027		0.010	0.012	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.015
4	0.079	0.085	0.081		0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.013	0.016
5	0.109	0.116	0.113	0.113		0.013	0.013	0.012	0.012	0.013	0.017
6	0.103	0.103	0.104	0.125	0.134		0.001	0.012	0.011	0.013	0.017
7	0.104	0.104	0.106	0.127	0.134	0.001		0.012	0.011	0.013	0.017
8	0.075	0.087	0.078	0.115	0.124	0.107	0.109		0.006	0.007	0.016
9	0.078	0.087	0.079	0.117	0.122	0.099	0.101	0.029		0.007	0.016
10	0.082	0.092	0.079	0.109	0.124	0.107	0.109	0.041	0.042		0.015
11	0.171	0.181	0.169	0.183	0.196	0.196	0.198	0.173	0.173	0.171	

1: *Galerucella californiensis*; 2: *G. pusilla*; 3: *G. tenella*; 4: *G. lineola*; 5: *G. viburni*; 6: *G. suturalis*; 7: *G. capreae*; 8: 睡莲小萤叶甲 *G. nymphaeae*; 9: 菱角萤叶甲 *G. birmanica*; 10: 褐背小萤叶甲 *G. grisescens*; 11: *Phaedon brassicae*.

### 2.4 数据组系统发育信号检验

以 11 种昆虫两两之间遗传距离为横坐标,转换(TS)和颠换(TV)数目为纵坐标,建立二维坐标图来估计序列碱基替换饱和度(图 1)。从图中可以看出,在遗传距离 0.1 左右时,TV 超过了 TS。TS 与遗传距离之间有很好的线性关系,尚未达到饱和,但 TV 随着 p 距离的增大逐渐趋于稳定,已达到饱和。

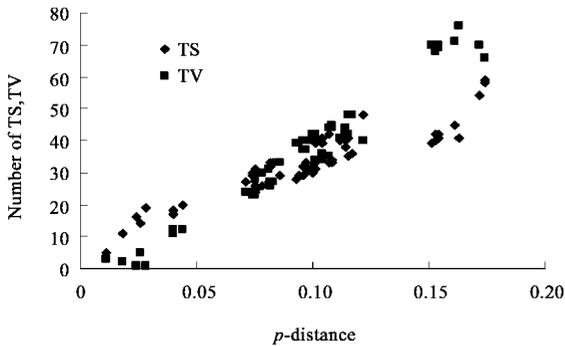


图 1 小萤叶甲属 CO I 基因碱基替换饱和性分析  
Fig. 1 The substitution saturation analysis of CO I gene of *Galerucella*

### 2.5 系统发育重建

2.5.1 距离法:在 MEGA 软件中,分别采用未校正的 p 距离、校正距离 Jukes-Cantor 和 Kimura-2 parameter 模型构建 NJ 树,基于各种模型的计算都得到了一个一致的拓扑结构。图 2 为 MEGA 软件中基于 Kimura-2 parameter 参数模型建立的 NJ 树,Bootstrap 1 000 次进行检验。

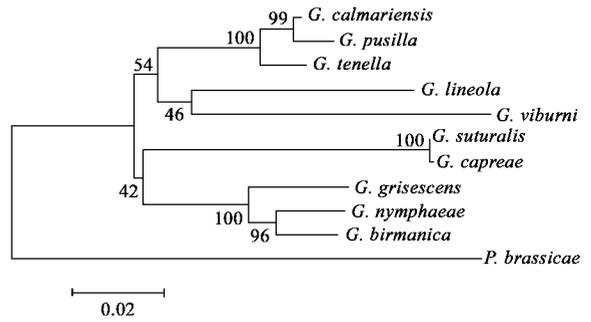


图 2 基于 Kimura-2 parameter 距离构建的小萤叶甲属 10 种昆虫的 NJ 树(自举 1 000 次)

Fig. 2 NJ tree of 10 species of *Galerucella* based on Kimura-2 parameter distance (1 000 bootstrap replicates)

2.5.2 最大似然法:在 PLYLIP 软件中运行 DNAPARS 程序,采用未加权的简约法对小萤叶甲属 10 种昆虫 CO I 基因序列进行分析,Bootstrap 重抽样 1 000 次进行检验得到最简约树(图 3)。

2.5.3 贝叶斯推论:BI 树使用 MrBayes 软件建立,运行 4 个马尔可夫链,选用 GTR + I + G 模型,共运行 200 000 代,每 10 代储存一次树,老化曲线显示在 80 000 代之后似然值已经达到饱和,故设定 burnin = 1 000(即从该树之后的树似然值达稳态),运行 sumt 命令计算剩余 12 001 树的 50% 合一树(图 4),即贝叶斯分析得到的系统发育树。

由图 2、图 3 和图 4 可以看出,10 种小萤叶甲均形成 4 个相同的簇群。*G. suturalis*、*G. capreae* 和 *G. viburni* 在传统分类学上曾分别隶属于绿萤叶甲

属和毛萤叶甲属,但在分子系统树上与小萤叶甲属的种类有着更近的亲缘关系。

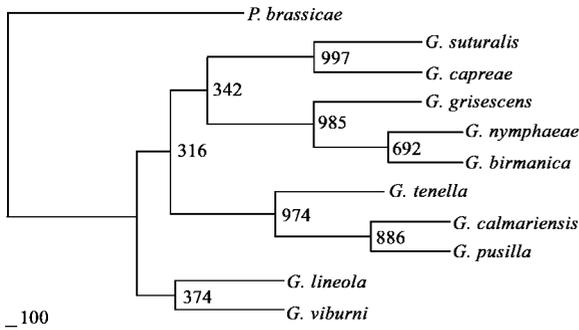


图3 小萤叶甲属 10 种昆虫 CO I 基因最简约树

Fig. 3 MP tree of 10 species of *Galerucella* based on CO I gene

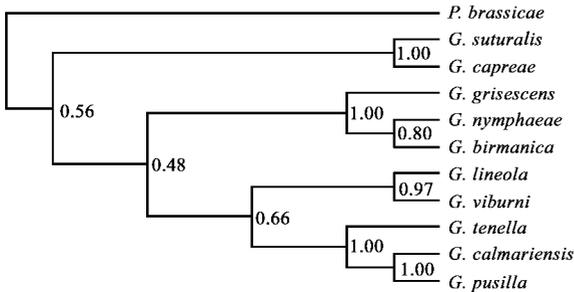


图4 小萤叶甲属 10 种昆虫贝叶斯推论的 50% 合一树

Fig. 4 50% consensus tree of 10 species of *Galerucella* constructed by Bayesian inference

## 4 讨论

小萤叶甲属的许多昆虫食性都较为单一,在杂草生物防治中有着广泛的应用前景。而其植食性特征又使其与寄主植物的关系密不可分,从而成为探讨昆虫与植物协同进化的理想材料,因此开展对其研究极具经济及理论意义(张丽杰,2004)。但传统分类学上曾将该属的一些种类划分到形态特征类似的属中,造成了该属分类系统较为混乱。因此,通过分子生物学方法来进一步验证传统的分类观点显得尤为重要。

CO I 基因(cytochrome oxidase I gene)即细胞色素氧化酶亚基 I 基因,是线粒体 DNA(mtDNA)13 个蛋白质编码基因之一,目前已利用该基因从各个分类水平探讨叶甲科昆虫系统发育研究(Szalanski et al., 2000; Clark et al., 2001; Becerra 2004)。本研究共测定了小萤叶甲属两种昆虫以及外群叶甲亚科小猿叶甲的 CO I 基因 720 bp 部分序列,同时与

GenBank 下载的 8 种萤叶甲 CO I 序列进行比较研究,转换与颠换比值总体为 0.9,其中第 3 位点的  $R$  值为 0.8,该位点颠换的饱和趋势较为明显,说明密码子第 3 位点出现了多重替换,碱基变异主要发生在第 3 位点。 $p$  距离检验的结果显示该序列片段具有较好的系统发育信号,可以用来进行小萤叶甲属的系统发育推断。

遗传距离的分析结果显示,小萤叶甲属的种类与外群间的遗传距离最大( $\geq 0.169$ ),小萤叶甲属内种间的遗传距离较小( $\leq 0.134$ )。

从系统发育重建的小萤叶甲属 10 种昆虫分子系统树中可以看出,3 种方法得到的系统树显示 10 种小萤叶甲均形成 4 个相同的簇群,菱角萤叶甲 *G. birmanica*、睡莲小萤叶甲 *G. nymphaeae*、褐背小萤叶甲 *G. grisescens* 聚为一簇,*G. birmanica* 和 *G. nymphaeae* 两种均取食睡莲科(陆自强等,1984; Pappers and van der Velde 2002)水生植物的种类在系统树上最先聚到一起,而与 *G. nymphaeae* 均取食蓼科植物的 *G. grisescens*(潘洪玉等,2002)也与二者聚为一类;*G. suturalis* 与 *G. capreae* 聚为一簇,这两种昆虫传统分类学上曾隶属于绿萤叶甲属 *Lochmaeata*,从 NJ 树和 MP 树可以看出,这两种昆虫与 *G. birmanica* 簇群亲缘关系最近,将其归类于小萤叶甲属是比较科学的;*G. lineola* 与 *G. viburni* 聚为一簇,*G. viburni* 传统分类学上曾隶属于毛萤叶甲属 *Pyrrhalta*,从系统树我们可以看出,其应被重新划分到小萤叶甲属,同时 *G. viburni* 与 *G. lineola* 有着相同的寄主(杨柳科)(虞佩玉等,1996; Weston and Hoebeke 2003; Ikonen et al., 2003)可能是导致它们亲缘关系较近的原因;*G. pusilla*、*G. calvariensis* 和 *G. tenella* 聚为一类,*G. pusilla* 与 *G. calvariensis* 均为防治千屈菜的天敌昆虫(Blossey et al., 1994),两者有着共同的生境和寄主植物,在进化树上也完全聚到一起。*G. lineola* 与 *G. calvariensis* 虽然有不同的寄主植物,但这两种昆虫具有共同的栖境,同时,这两种昆虫都长期受到同一种寄生蜂 *Asecodes mento* 的寄生(Hambäck et al., 2006),这也可能是导致 *G. lineola* 与 *G. calvariensis* 和 *G. pusilla* 聚在一起的原因(表 1)。

尽管本文涉及的种类较少,但在一定程度上说明了将线粒体 CO I 基因作为遗传标记运用于小萤叶甲属系统分类研究是理想的方法之一。如果在下一步的实验中增加小萤叶甲属种类的数量及重复,同时采用多种不同的分子标记,将会更好的阐明小

## 萤叶甲属昆虫的进化与寄主植物之间的相互关系。

## 参 考 文 献 (References)

- Avisé JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC, 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* , 18 : 489 – 522.
- Avisé JC, Nelson WS, Sugita H, 1994. A speciation history of “living fossils”: molecular evolutionary patterns in horseshoe crabs. *Evolution* , 48 : 1986 – 2001.
- Becerra JX, 2004. Molecular systematics of *Blepharida* beetles (Chrysomelidae: Alticinae) and relatives. *Mol. Phylogenet. Evol.* , 30 : 107 – 117.
- Blossey B, Schroeder D, Hight SD, Malecki RA, 1994. Host specificity and environmental impact of two leaf beetles (*Galerucella californiensis* and *G. pusilla*) for biological control of purple loosestrife (*Lythrum salicaria*). *Weed Sci.* A2 : 134 – 140.
- Caterino MS, Cho S, Sperling FAH, 2000. The current state of insect molecular systematics: a thriving tower of babel. *Annu. Rev. Entomol.* , 45 : 1 – 54.
- Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD, 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.* , 31 : 3497 – 3500.
- Clark TL, Meinke LJ, Foster JE, 2001. Molecular phylogeny of *Diabrotica* beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) inferred from analysis of combined mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Insect Mol. Biol.* , 10(4) : 304 – 314.
- Ding JQ, Blossey B, Du YZ, Zheng FS, 2006. *Galerucella birmanica* (Coleoptera: Chrysomelidae), a promising potential biological control agent of water chestnut, *Trapa natans*. *Biol. Control* , 36 : 80 – 90.
- Felsenstein J, 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* , 39 : 783 – 791.
- Felsenstein J, 2006. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.66. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Hambäck PA, Stenberg JA, Ericson L, 2006. Asymmetric indirect interactions mediated by a shared parasitoid: connecting species traits and local distribution patterns for two chrysomelid beetles. *Oecologia* , 148(3) : 475 – 481.
- Harrison RG, 1989. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends Ecol. Evol.* , 4 : 6 – 11.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F, 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* , 17 : 754 – 755.
- Ikonen A, Sipura M, Miettinen S, Tahvanainen J, 2003. Evidence for host race formation in the leaf beetle *Galerucella lineola*. *Entomol. Exp. Appl.* , 108(3) : 179 – 185.
- Kaufman LN, Landis DA, 2000. Host specificity testing of *Galerucella californiensis* L. (Coleoptera: Chrysomelidae) on wild and ornamental plant species. *Biol. Control* , 18 : 157 – 164.
- Kimura M, 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* , 16 : 111 – 120.
- Kluge AG, Farris JS, 1969. Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Syst. Zool.* , 18 : 1 – 32.
- Kumar S, Tamura K, Nei M, 2004. MEGA 3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* , 5(2) : 150 – 163.
- Lin ZH, Yang JQ, Lai LX, Zhang YZ, Chen JH, 2006. The effect of *G. griseascens* on controlling *P. lapathifolium*. *Acta Tabacaria Sin.* , 12(2) : 34 – 37. [林智慧, 杨建全, 赖禄祥, 张玉珍, 陈家骅, 2006. 烟田蓼科杂草的重要天敌——褐背小萤叶甲对酸模叶蓼的控制效果研究. *中国烟草学报*, 12(2) : 34 – 37]
- Liu H, Beckenbach AT, 1992. Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene among ten orders of insects. *Mol. Phylogenet. Evol.* , 1 : 41 – 52.
- Lu ZQ, Zhu J, Zhu SD, Chen ZD, 1984. Preliminary studies on the beetle (*Galerucella birmanica* Jacoby) – an insect pest of waterchestnut and watershield. *Sci. Agric. Sin.* , 5 : 73 – 76. [陆自强, 朱建, 祝树德, 陈志栋, 1984. 菱角、莼菜害虫——菱角萤叶甲的研究. *中国农业科学*, 5 : 73 – 76]
- Lunt DH, Zhang DX, Szymura JM, Hewitt GM, 1996. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Mol. Biol.* , 5 : 153 – 165.
- McAvoy TJ, Kok LT, 2004. Temperature dependent development and survival of two sympatric species, *Galerucella californiensis* and *G. pusilla*, on purple loosestrife. *BioControl* , 49 : 467 – 480.
- Moritz C, Dowling TE, Brown WM, 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* , 18 : 269 – 292.
- Nokkala C, Nokkala S, 2004. Molecular phylogeny and systematics of *Galerucella* and related taxa. In: Jolivet P, Santiago-Blay JA, Schmitt M eds. *New Developments in the Biology of Chrysomelidae*. Hague: SPB Academic Publishing. 125 – 130.
- Pan HY, Xi JH, Wang XM, Duan JT, 2006. Host selection of *Galerucella griseascens*. *Journal of Jilin Agricultural University* , 22(3) : 30 – 33. [潘洪玉, 席景会, 王旭明, 段金太, 2006. 褐背小萤叶甲对寄主植物选择特性的研究. *吉林农业大学学报*, 22(3) : 30 – 33]
- Pappers SM, van der Velde G, 2002. Host preference and larval performance suggest host race formation in *Galerucella nymphaeae*. *Oecologia* , 130 : 433 – 440.
- Saitou N, Nei M, 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* , 4 : 406 – 425.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1992. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 304 – 314.
- Simon C, 1991. Molecular systematics at the species boundary: exploiting conserved and variable regions of the mitochondrial genome of animals via direct sequencing from amplified DNA. In: Hewitt GM, Johnston AWB, Young JPW eds. *Molecular Techniques in Taxonomy*. Berlin: Springer Verlag. 33 – 72.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P, 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Ent. Soc. Am.* , 87 : 651 – 701.

- Szalanski AL, Roehrdanz RL, Taylor DB, 2000. Genetic relationship among *Diabrotica* species ( Coleoptera : Chrysomelidae ) based on rDNA and mtDNA sequences. *Florida Entomol.*, 83( 2 ): 262 – 267.
- Tanaka M, Nakasuji F, 2002. Dynamic interaction between a leaf beetle, *Galerucella nipponensis*, and an aquatic plant, *Trapa japonica* II : Dispersal behavior of larvae. *Popul. Ecol.*, 44 : 1 – 6.
- Weston PA, Hoebeke ER, 2003. Viburnum leaf beetle, *Pyrrhalta viburni* ( Paykull ) ( Coleoptera : Chrysomelidae ) : Dispersal pattern of a palearctic landscape pest in New York and its distribution status in the northeastern US and eastern Canada. *Pro. Entomol. Soc. Wash.*, 105( 4 ): 889 – 895.
- Wiebe AP, Cortilet AB, Obrycki JJ, Owen MDK, 2001. Releases of natural enemies of purple loosestrife ( *Lythrum salicaria* L. ), in Iowa wetlands. *J. Kans. Entomol. Soc.*, 74( 2 ): 106 – 109.
- Wilcox JA, 1971. Pars 78. Fasc 1. ( editio secunda ). Chrysomelidae : Galerucinae. Oidini, Galerucini, Metacyclini, Sermlylini. In : Wilcox JA ed. *Coleopterorum Catalogus Supplementa*. W. Junk, The Hague. 67 – 74.
- Yu PY, Wang SY, Yang XK, 1996. Economic Insect Fauna of China Fasc. 54 Coleoptera : Chrysomelidae ( II ). Beijing : Science Press. 324 pp. [ 虞佩玉, 王书永, 杨星科, 1996. 中国经济昆虫志, 第五十四册, 鞘翅目, 叶甲总科( 二 ). 北京 : 科学出版社. 324 页 ]
- Zhang LJ, 2004. Study on the Systematics of Luperini from China ( Coleoptera : Chrysomelidae : Galerucinae ). PhD Thesis, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing. 469 pp. [ 张丽杰, 2004. 中国根萤叶甲族系统分类学研究( 鞘翅目 : 叶甲科 : 萤叶甲亚科 ). 中国科学院动物研究所博士学位论文. 469 页 ]

( 责任编辑 : 袁德成 )