论 文

基于线粒体基因组数据的扁甲系总科间系统发育关系分析

唐培安^{1†*}, 李敏^{2†}, 冯润秋², 王娟², 刘蔓文¹, 王亚洲¹, 袁明龙^{2*}

1. 南京财经大学食品科学与工程学院, 江苏省现代粮食流通与安全协同创新中心, 南京 210023;

2. 兰州大学草地农业生态系统国家重点实验室, 兰州大学农业农村部草牧业创新重点实验室, 兰州大学草地农业科技学院, 兰州 730020

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: tangpeian@163.com; yuanml@lzu.edu.cn

收稿日期: 2018-06-14; 接受日期: 2018-10-29; 网络版发表日期: 2019-01-14

国家重点研发计划(批准号: 2016YFD0401004-4, 2017YFD0401003-5)、江苏省六大人才高峰项目(批准号: NY-057)、江苏省高校自然科学基金面上项目(批准号: 17KJB210005)、国家自然科学基金(批准号: 31000828)和江苏高校优势学科建设工程资助

摘要 扁甲系是鞘翅目多食亚目中最大的一个类群, 具有重要的经济意义. 尽管扁甲系昆虫的单系性得到广泛支持, 但7个总科间的系统进化关系仍存在不确定性. 为此, 本研究测定了锈赤扁谷盗和锯谷盗的线粒体基因组, 并联合已测的67个扁甲系昆虫线粒体基因组, 构建了扁甲系昆虫总科间的系统发育关系, 并采用似然值检验对不同的树拓扑结构进行了评价. 结果表明, 锈赤扁谷盗全线粒体基因组的大小为15497 bp, 编码13个蛋白质编码基因、22个转运RNA基因和2个核糖体RNA基因. 锯谷盗接近全长的线粒体基因长为13588 bp, 编码34个基因, 缺少*trnI*, *trnQ*和*trnM*等3个转运RNA基因. 锈赤扁谷盗和锯谷盗线粒体基因的基因含量、基因排序、碱基组成、密码子使用等特征, 与大多数已测鞘翅目昆虫的线粒体基因组高度相似. 基于3个线粒体基因数据集及3种树构建方法的系统发育分析结果表明, 瓢虫总科、叶甲总科、象甲总科、拟步甲总科和郭公虫总科等5个类群均为单系性, 而扁甲总科始终为并系. 树拓扑结构检验结果表明, 扁甲系总科间的系统发育关系为((郭公虫总科+瓢虫总科)+(拟步甲总科+(扁甲总科(叶甲总科+象甲总科)))). 尽管线粒体数据集的构成及系统发育分析方法对树拓扑结构具有重要影响, 但线粒体基因组数据在扁甲系昆虫系统与进化研究方面具有重要应用价值.

关键词 线粒体DNA, 甲虫, 系统发育分析, 最大似然法, 贝叶斯推断, 拓扑结构检验

扁甲系(Cucujiformia)是鞘翅目(Coleoptera)多食亚目(Polyphaga)中最大的一个类群, 目前全世界已报道的种类超过173000种^[1]. 扁甲系昆虫具有重要的经济意义, 既包括许多重大的农林牧业害虫, 也包括众多重要的天敌昆虫、传粉昆虫和药用昆虫. 目前, 扁甲

系昆虫通常分为6个总科, 即郭公虫总科(Cleroidea)、扁甲总科(Cucujoidea)、象甲总科(Curculionidea)、叶甲总科(Chrysomeloidea)、拟步甲总科(Tenebrionidea)和筒蠹总科(Lymexyloidea)^[1~3]. 在过去的20多年中, 基于形态学特征及分子数据对扁甲系昆虫的系统

引用格式: 唐培安, 李敏, 冯润秋, 等. 基于线粒体基因组数据的扁甲系总科间系统发育关系分析. 中国科学: 生命科学, 2019, 49: 163–171
Tang P A, Li M, Feng R Q, et al. Phylogenetic relationships among superfamilies of Cucujiformia (Coleoptera: Polyphaga) inferred from mitogenomic data (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2019, 49: 163–171, doi: 10.1360/N052018-00119

进化关系进行了广泛探讨, 但有关总科间的系统发育关系还未完全解决^[1,2,4,5]. 特别是, 有关扁甲总科的单系性及其系统发育地位最具争议性. Hunt等人^[2]基于3个基因(*cox1*, *16S*和*18S*)首次大规模分析了鞘翅目1900余种的系统发育关系, 发现扁甲总科是一并系群, 且支持皮坚甲群(cerylonid group或cerylonid series)的单系性; 这一结论也被之后的形态学及分子系统发育研究所支持^[6,7]. 目前, 皮坚甲群已被正式命名为扁甲系的一个新总科, 即瓢虫总科(Coccinelloidea)^[1]. 然而, 瓢虫总科与扁甲总科的系统发育关系、扁甲总科其余科的单系性及科间的系统发育关系仍存在不确定性^[1,2,6].

昆虫线粒体基因组是一个大约15~18 kb的环状双链DNA分子, 通常编码37个基因, 即13个蛋白质编码基因(PCGs)、22个转运RNA基因(tRNAs)和2个核糖体RNA基因(*rrnL*和*rrnS*)^[8,9]. 此外, 线粒体基因组通常还有一个负责复制和转录的非编码区, 即控制区^[9]. 由于线粒体基因组具有母系遗传、多拷贝、缺少遗传重组以及进化速率快等特点, 已广泛应用于比较基因组学、分子进化、系统发育重建、谱系地理学及种群遗传学等研究领域^[8,10,11]. 在过去的10年中, 昆虫线粒体基因组研究受到了高度关注, 并由于高通量测序技术的广泛应用而使得已测线粒体基因组的昆虫种类呈快速增长的趋势. 目前, 线粒体基因组数据广泛用于探讨鞘翅目昆虫不同分类阶元的系统进化关系, 并高度支持扁甲系的单系性^[4,5]. 然而, 基于线粒体基因组数据的扁甲系总科间的系统进化关系仍具有不确定性. 一方面, 一些类群仅有较少的物种进行了线粒体基因组测序, 如扁甲总科昆虫; 另一方面, 不同的线粒体基因组数据集的构成、不同的系统发育分析方法对系统发育的构建的结果也存在重要影响. 因此, 测序更多扁甲系昆虫, 特别是扁甲总科昆虫的线粒体基因组, 并比较分析不同系统发育分析方法在构建扁甲系系统进化关系方面的价值和潜力, 显得非常必要.

本研究测定了锈赤扁谷盗(*Cryptolestes ferrugineus*)和锯谷盗(*Oryzaephilus surinamensis*)的线粒体基因组, 进一步丰富了扁甲总科的线粒体基因组数量. 在注释这2个新测线粒体基因组的基础上, 联合NCBI中的67个扁甲系昆虫的线粒体基因组, 基于3个线粒体基因组数据集(P123, P123_2rRNA和AA), 采用3种方法(RAxML, MrBayes和PhyloBayes)构建了扁甲系昆虫总科间的系统发育关系, 并采用似然值检验对不同

的树拓扑结构进行了评价.

1 材料与方法

1.1 基因组DNA提取、PCR扩增及测序

锈赤扁谷盗和锯谷盗成虫样本于2016年分别采集于江苏苏州和湖南常德, 采集活体后, 浸泡在无水乙醇中, 并保存于-80℃. 采用DNA提取试剂盒(天根生物, 北京)提取单头昆虫的基因组总DNA. 采用昆虫通用引物及新设计的特异引物扩增锈赤扁谷盗和锯谷盗的线粒体基因组, 引物序列及来源见网络版表1. PCR扩增采用LA Taq酶(TaKaRa, 日本)在25 μL体系中进行; 所有PCR扩增片段, 经电泳检测、纯化后送至上海生工生物工程技术有限公司直接进行双向测序(测序引物同PCR扩增); 对于测序失败或测序结果不理想的片段, 克隆后送菌液进行双向测序.

1.2 序列分析

为保证序列的准确读取, 对测序结果进行人工校正, 保证碱基识别与原始测序峰图的一致性. 去除载体及引物序列后, 对每一PCR片段的双向测序结果进行拼接, 获得该目的片段的正确序列. 锈赤扁谷盗和锯谷盗的13个线粒体蛋白编码基因、2个rRNA基因及22个tRNA基因的注释, 均采用已发表文献^[12,13]中的方法进行. 蛋白质编码基因采用NCBI的在线软件ORF(open reading frame)进行鉴定; 蛋白编码基因确定后, 两个最大的非编码区分别作为核糖体大亚基基因(*rrnL*)和小亚基基因(*rrnS*), 并进行Blast比对; 采用软件tRNAscan-SE 1.21^[14]鉴定tRNA基因, 并预测其二级结构. 采用Mega 6.06^[15]分析碱基组成和密码子使用, 并计算AT-偏斜=[A-T]/[A+T]和GC-偏斜=[G-C]/[G+C]^[16].

1.3 系统发育分析

采用本研究新测的锈赤扁谷盗和锯谷盗线粒体基因组, 联合GenBank中已有的67种扁甲系昆虫线粒体基因组进行系统发育分析, 并以金龟甲系(Scarabaeiformia)的2个物种(*Lucanus mazama*和*Rhopaea magnicornis*)作为外群(网络版表2). 采用TranslatorX online server^[17]的MAFFT对13个蛋白编码基因分别进行序列

比对, 并采用GBlocks去除空位及模糊位点, 将比对好的单个蛋白质编码基因联合在一起获得线粒体基因数据集. 两个rRNA基因的序列比对, 采用已发表文献^[4]中的方法进行. DAMBE分析结果表明, 除*rrnS*在不对称树(asymmetrical tree)的情况下达到饱和外, 其余数据集均未达到显著饱和(网络版表3). 为了明确线粒体数据集的构成差异对系统发育结果的影响, 构建了3个线粒体数据集: 即P123(核苷酸序列, 包括13个蛋白质编码基因的3个密码子位点)、P123_2rRNA(核苷酸序列, P123加上2个核糖体rRNA基因)和AA(P123对应的氨基酸序列). 对这3个数据集, 分别采用PartitionFinder 1.1.1^[18]选择序列的最佳分区及进化模型, 并将结果用于后续系统发育分析(网络版表4).

对P123, P123_2rRNA和AA等3个数据集, 分别采用RAXML(ML), MrBayes(BI)和PhyloBayes等3种方法构建扁甲系昆虫的系统进化关系. 所有系统发育分析, 均在CIPRES Science Gateway 3.3^[19]在线平台上完成. ML分析用RAxML-HPC2 on XSEDE 8.0.24^[20]进行, 采用GTRGAMMAI模型, 支的可靠性采用1000次的bootstrap进行评估. 贝叶斯BI分析采用MrBayes 3.2.2^[21]进行, 4条独立的马尔可夫链(Markov chains), 即3条热链(hot chain)和1条冷链(cold chain)同时运行 1×10^8 代(generation). 每运行1000带取样一次, 当ESS(estimated sample size) >100 且PSRF(potential scale reduction factor)接近1.0时即认为两个分析过程趋于稳定状态. 舍弃25%的老化样本, 剩余样本用来构建50%一致树, 并计算贝叶斯后验概率. PhyloBayes分析采用PhyloBayes MPI 1.5a在贝叶斯位点异质模型(site-heterogeneous model)下进行; 运行时, 移除不变位点, 2条独立的链起始于一个随机树, 并设置为CAT-poisson模型; 其余参数为CIPRES Science Gateway平台上PhyloBayes软件的默认设置.

由于不同的数据集及树构建方法获得的扁甲系总科间的系统发育关系存在不一致性, 因此为了明确哪种系统发育树值得信任, 我们采用IQ-TREE web server(<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>)进行树拓扑结构检验^[22]. 对P123, P123_2rRNA和AA等3个数据集, 分别采用SH(Shimodaira-Hasegawa test)^[23], WKH(weighted Kishino-Hasegawa test)^[24], WSH(weighted SH test)^[23]和AU(approximately unbiased test)^[25]等4种方法进行统计分析, 并设置1000次重复(replicates).

2 结果与分析

2.1 锈赤扁谷盗和锯谷盗线粒体基因组的基本特征

通过PCR扩增、测序, 我们获得了锈赤扁谷盗完整的线粒体基因组(GenBank登录号: MH475917)以及接近全长的锯谷盗线粒体基因组(GenBank登录号: MH475916). 锈赤扁谷盗线粒体基因组是一个典型的闭合环状双链DNA分子, 大小为15497 bp(网络版表5和网络版表6), 编码37个线粒体基因, 即13个PCGs, 22个tRNAs和2个rRNAs, 且基因排序与节肢动物线粒体基因的原始排序完全一致^[8,9]. 锯谷盗线粒体基因组大小为13588 bp, 编码34个基因, 缺少trnI, trnQ和trnM等3个位于控制区附近的tRNAs(网络版表5和网络版表6).

锈赤扁谷盗和锯谷盗线粒体基因组结构较为紧凑, 除线粒体控制区外, 仅有几个小的非编码区, 即基因间隔区. 其中, 最大的基因间隔区均位于*trnS2*和*nad1*之间, 大小分别为18和28 bp(网络版表5和网络版表6). 研究表明, 该基因间隔区所在的位置及序列在不同昆虫中具有保守性^[4,26,27], 且包含可与线粒体转录因子DmTTF结合的位点^[28]. 与其他已测目昆虫相似, 锈赤扁谷盗和锯谷盗线粒体基因组的碱基组成明显偏向于A+T: J-链的A%+T%分别为77.0%和72.1%, 13个PCGs的A%+T%含量分别为75.4%和70.9%, tRNAs的A%+T%分别为77.5%和78.1%, *rrnL*的A%+T%分别为82.0%和76.4%. 锈赤扁谷盗和锯谷盗13个PCGs的3个核苷酸位点, 其A%+T%有明显差异, 第3位点的A%+T%均明显高于前两个位点(表1). 两个线粒体基因组J-链的AT-偏斜均为正值(0.101), 而GC-偏斜为负值(-0.181), 这与大多数昆虫线粒体基因组核苷酸偏斜的规律一致^[29].

锈赤扁谷盗和锯谷盗线粒体基因组高的A+T含量及不同链上核苷酸的偏斜性, 也反映在蛋白质编码基因的密码子使用上(网络版表7). 相对同义密码子使用频率(relative synonymous codon usage, RSCU)分析表明, 以A或T结尾的同义密码子出现的次数远大于其他同义密码子出现的次数, 即AT含量丰富的密码子被频繁使用(网络版表7). 锯谷盗线粒体基因组使用了无脊椎动物的62种线粒体密码子, 而锈赤扁谷盗线粒体基因组没有使用UCG密码子. 6个完全由A和T组成的密码子(TTT, TTA, ATT, ATA, TAT和AAT)在锈赤扁谷盗

表 1 锈赤扁谷盗和锯谷盗线粒体基因组的碱基组成

Table 1 Base composition of mitochondrial genomes of *Cryptolestes ferrugineus* and *Oryzaephilus surinamensis*

	锈赤扁谷盗			锯谷盗		
	A+T (%)	AT-skew	GC-skew	A+T (%)	AT-skew	GC-skew
全线粒体基因组	77.0	0.014	-0.200	72.1	0.136	-0.325
蛋白质编码基因	75.4	-0.168	-0.012	70.9	-0.116	-0.076
蛋白质编码基因第1位点	69.3	-0.037	0.167	66.6	0.019	0.116
蛋白质编码基因第2位点	68.5	-0.393	-0.120	66.7	-0.388	-0.150
蛋白质编码基因第3位点	88.4	-0.098	-0.191	79.5	-0.001	-0.270
转运RNA基因	77.5	0.032	0.108	78.1	0.033	0.111
核糖体16S基因	82.0	-0.014	0.365	76.4	-0.174	0.411
核糖体12S基因	80.1	0.050	0.290			
线粒体控制区	85.6	-0.051	-0.175			

和锯谷盗线粒体基因组中的使用频率均最高，它们的含量占分别占45%和35%。锈赤扁谷盗和锯谷盗线粒体基因组的这种密码使用模式，与已测其他扁甲系昆虫的高度相似^[4]。

除*nad1*外，锈赤扁谷盗其余12个蛋白质编码基因的起始密码子均为ATN，而锯谷盗的*nad1*和*cox1*没有以典型的ATN作为起始密码子。锈赤扁谷盗和锯谷盗的大多数蛋白质编码基因使用不完全的终止密码子T和TA。不完全的终止密码子在昆虫线粒体基因组中普遍存在，推测在转录过程中通过添加A可以将这些不完整的终止密码子补全而并不影响翻译^[30,31]。除*trnSI*外，锈赤扁谷盗和锯谷盗的其余线粒体tRNAs均具有经典的三叶草结构，包括T Ψ C臂、氨基酸接受臂、反密码子臂和双氢尿嘧啶(dihydrouridine, DHU)臂。

2.2 系统发育分析

基于3个数据集(P123, P123_2rRNA 和AA)和3种系统发育分析方法(RAxML, MrBayes和PhyloBayes), 总共获得了9个系统发育树(图1, 网络版图1~网络版图8)。尽管这9个系统发育树的拓扑结构不完全一致，但均不同程度地支持瓢虫总科、叶甲总科、象甲总科和拟步甲总科等4个总科的单系性(表1)。除2个数据集(P123和P123_2rRNA)的ML树外，其余7个系统发育分析均不同程度支持郭公虫总科的单系性。相反，所有的系统发育分析均不支持扁甲总科的单系性，这与基于形态学及分子数据的已有研究结果一致^[1,2,4~7,32,33]。扁甲总科是多食亚目扁甲系中种类多、系统分类仍有争

议的一个类群，目前包括25个科^[1,2,6,7]。本研究测定的锈赤扁谷盗和锯谷盗分别代表了扁谷盗科(Laemophloeidae)和锯谷盗科(Silvanidae)，将扁甲总科中已测线粒体基因组的科数从8个增加至10个。尽管物种数及科数的增加并未解决扁甲总科的并系性问题，但本研究的结果支持扁甲总科与象甲科和叶甲科构成一单系群(图1, 网络版图1~网络版图8)。

三种系统发育树构建方法中，ML树的支持率相对较低；例如，ML树对叶甲总科单系性的支持率均小于70，而BI树和PhyloBayes树的支持率均大于0.92(表1)。此外，某些被贝叶斯系统树支持的系统发育关系，并不被ML树支持。例如，基于2个数据集(P123和P123_2rRNA)的BI树和PhyloBayes树均支持拟步甲总科与扁甲总科、叶甲总科和象甲总科等3个总科构成姊妹群关系，但ML树并不支持这一关系(表1)。这表明，尽管采用RAxML的最大似然法在系统发育分析中广泛应用，但该软件在构建某些类群的系统发育关系方面有时表现欠佳，这与其他已有研究结果一致^[4,13,34,35]。

综合比较9个系统发育树发现，核苷酸数据较氨基酸数据表现出更好的系统发育信息(表2, 图1, 网络版图1~网络版图8)。例如，基于2个数据集(P123和P123_2rRNA)的BI树均支持叶甲总科与象甲总科为姊妹群关系，但氨基酸数据集的BI树并不支持这一关系。尽管*rrnS*表现出了一定程度的序列饱和度，但与P123相比，包含2个rRNA基因的数据集(P123_2rRNA)具有更高的系统发育分辨率。例如，基于P123_2rRNA和P123的ML树，仅前者支持叶甲总科与象甲总科为姊

图 1 基于P123_2rRNA的贝叶斯(MrBayes)系统发育树

Figure 1 Bayesian phylogenetic tree based on the P123_2rRNA dataset

表 2 不同数据集、不同方法获得的扁甲系总科间的系统发育结果^{a)}

Table 2 Phylogenetic relationships among superfamilies with Cucujiformia based on different datasets and analytical methods

系统发育关系	P123			P123_2rRNA			AA		
	BI	ML	PhyloBayes	BI	ML	PhyloBayes	BI	ML	PhyloBayes
郭公虫总科是单系群	0.68	—	1	1	—	1	1	99	1
瓢虫总科是单系群	1	82	1	1	84	1	1	96	1
叶甲总科是单系群	1	46	0.99	1	67	0.99	0.92	55	0.99
扁甲总科是单系群	—	—	—	—	—	—	—	—	—
象甲总科是单系群	1	100	1	1	100	1	1	100	1
拟步甲总科是单系群	1	100	1	1	100	1	1	100	1
CLE+COC	0.68	—	—	1	—	—	—	—	—
(CLE, COC)+(TEN, CUC, CHR, CUR)	1	—	—	1	—	—	—	—	—
TEN+(CUC, CHR, CUR)	0.68	—	0.87	0.99	—	0.83	—	—	0.98
CUC+(CHR, CUR)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CLE+(COC, TEN, CUC, CHR, CUR)	—	—	1	—	—	1	1	100	1
COC+(TEN, CUC, CHR, CUR)	—	—	0.83	—	—	0.59	—	—	0.89
CHR+CUR	0.98	—	0.99	1	44	0.99	—	—	0.87
TEN+COC	—	—	—	—	—	—	0.78	41	—
(TEN, COC)+(CUC, CHR, CUR)	—	—	—	—	—	—	1	78	—

a) CLE, 郭公虫总科; COC, 瓢虫总科; TEN, 拟步甲总科; CUC, 扁甲总科; CHR, 叶甲总科; CUR, 象甲总科

妹群。这表明, 包含RNA的线粒体基因组数据更有助于解决扁甲系总科间的系统发育关系, 这与作者前面的研究结果一致^[4]。

2.3 树拓扑结构检验

按照扁甲总科间的系统发育关系, 本研究的9个系统发育树共有5种不同的树拓扑结构(表3)。树拓扑结构检验结果表明, 基于3个数据集的树拓扑结构检验, 获得了高度一致的结果, 均支持P123和P123_2rRNA两个数据集BI树总科间的系统发育关系, 即((郭公虫总科+瓢虫总科), (拟步甲总科+(扁甲总科(叶甲总科+象甲总科))))(表3, 图1)。叶甲总科与象甲总科互为姊妹群, 这一关系在前面的分子系统研究中得到了广泛支持^[2,4-6,32]。与之前基于线粒体基因组数据的研究结果相同^[4,5], 原扁甲总科中的皮坚甲群, 即最新命名的瓢虫总科在所有系统发育树中均为单系群, 但其系统位置在不同的系统发育树中不完全一致。系统发育结果表明, 瓢虫总科的系统位置有3种情况(表3): (i) 拓扑结构检验支持度最高的是瓢虫总科与郭公虫总科互为姊妹群, 这一关系也与之前的研究结果一致^[2,4]; (ii)

瓢虫总科位于除郭公虫总科外其余4个总科的基部, 拓扑结构检验支持度较低, 但前面的一些研究也发现该系统关系^[32]; (iii) 瓢虫总科与拟步甲总科为姊妹群, 尽管该结果与之前的研究一致^[5], 但拓扑结构检验完全不支持这一关系。基于相同数据集的SH检验结果表明, 瓢虫总科前两种系统位置的概率较为接近, 表明瓢虫总科的系统位置还需进一步探讨。

不同的研究因在数据集构成、分析方法及物种数量等方面存在差异, 获得的扁甲总科间的系统发育关系差异很大。Hunt等人^[2]基于3个基因(*cox1*, *16S*和*18S*)的系统发育分析发现, 小蕈甲科(Sphindidae)与皮扁甲科(Phloeostichidae)聚在一起, 且与象甲总科为姊妹群关系。尽管扁甲科(Cucujidae)很可能是锯谷盗科的姊妹群^[36,37], 但很少有分子数据支持这一关系。Robertson等人^[1]基于8个基因的系统发育分析表明, 扁甲科与锯谷盗科为姊妹群关系, 且两者与扁谷盗科聚在一起。本研究结果表明(图1), 扁甲总科分为两个单系群: 小蕈甲科和锯谷盗科聚在一起, 位于扁甲总科、象甲总科和叶甲总科的最基部; 包括扁甲科和扁谷盗科在内的其余8个科构成了另一个单系群, 与象甲总

表 3 系统发育树拓扑结构检验结果^{a)}

Table 3 Results of topological tests for five phylogenetic trees

数据集	拓扑结构	−Ln likelihood	SH	WKH	WSH	AU
P123	1. (outgroup, (CLE, COC, TEN, CUC, CHR, CUR))	−424561.9	0	0	0	0.01
	2. (outgroup, ((CLE, COC), (TEN, (CUC, (CHR, CUR)))))	−423109.3	0.86	0.79	0.98	0.77
	3. (outgroup, (CLE, (COC, (TEN, (CUC, (CHR, CUR)))))	−423114.5	0.82	0.20	0.61	0.22
	4. (outgroup, (CLE, COC, TEN, (CUC, (CHR, CUR))))	−423473.8	0	0	0	0
	5. (outgroup, (CLE, ((COC, TEN), (CUC, CHR, CUR))))	−423196.2	0.25	0	0	0.01
P123_2rRNA	1. (outgroup, (CLE, COC, TEN, CUC, CHR, CUR))	−460963.0	0	0	0	0
	2. (outgroup, ((CLE, COC), (TEN, (CUC, (CHR, CUR)))))	−459379.3	0.87	0.82	0.99	0.83
	3. (outgroup, (CLE, (COC, (TEN, (CUC, (CHR, CUR)))))	−459386.1	0.82	0.17	0.52	0.16
	4. (outgroup, (CLE, COC, TEN, (CUC, (CHR, CUR))))	−459792.6	0	0	0	0.01
	5. (outgroup, (CLE, ((COC, TEN), (CUC, CHR, CUR))))	−459481.1	0.20	0	0	0.01
Amino acid	1. (outgroup, (CLE, COC, TEN, CUC, CHR, CUR))	−212140.1	0	0	0	0.01
	2. (outgroup, ((CLE, COC), (TEN, (CUC, (CHR, CUR)))))	−210383.3	0.87	0.92	0.99	0.93
	3. (outgroup, (CLE, (COC, (TEN, (CUC, (CHR, CUR)))))	−210395.9	0.73	0.07	0.28	0.06
	4. (outgroup, (CLE, COC, TEN, (CUC, (CHR, CUR))))	−210811.9	0	0	0	0
	5. (outgroup, (CLE, ((COC, TEN), (CUC, CHR, CUR))))	−210479.6	0.25	0	0	0.01

a) 下划线表示非单系群. CLE, 郭公虫总科; COC, 瓢虫总科; TEN, 拟步甲总科; CUC, 扁甲总科; CHR, 叶甲总科; CUR, 象甲总科.

科和叶甲总科为姊妹群关系. 扁谷盗科与展扁甲科 (Propalticidae) 为姊妹群关系, 这与前面基于形态学及分子数据的分析一致^[1,7]. 考虑到本研究仅包括了扁甲总科25个科中的10个科, 对其余15个科进行线粒体基因组测序, 并联合核基因和形态学数据进行综合分析, 可为扁甲总科内部类群的系统进化提供新的认识.

3 结论

本研究测定的锈赤扁谷盗和锯谷盗线粒体基因组, 基因含量、基因排序、碱基组成、密码子使用模

式及tRNA二级结构等与大部分已测鞘翅目昆虫高度相似. 基于3个线粒体基因数据集及3种树构建方法的系统发育分析结果表明, 瓢虫总科、叶甲总科、象甲总科、拟步甲总科和郭公虫总科等5个类群均为单系性, 而扁甲总科始终为并系. 树拓扑结构检验结果表明, 扁甲系总科间的系统发育关系为((郭公虫总科+瓢虫总科), (拟步甲总科+(扁甲总科(叶甲总科+象甲总科)))). 尽管线粒体数据集的构成及系统发育分析方法对树拓扑结构具有重要影响, 但线粒体基因组数据在扁甲系昆虫系统与进化研究方面具有重要应用价值.

参考文献

1 Robertson J A, Ślipiński A, Moulton M, et al. Phylogeny and classification of Cucujoidea and the recognition of a new superfamily Coccinelloidea (Coleoptera: Cucujiformia). *Syst Entomol*, 2015, 40: 745–778

2 Hunt T, Bergsten J, Levkanicova Z, et al. A comprehensive phylogeny of beetles reveals the evolutionary origins of a superradiation. *Science*, 2007, 318: 1913–1916

3 Bouchard P, Bousquet Y, Davies A E, et al. Family-group names in Coleoptera (Insecta). *Zookeys*, 2011, 88: 1–972

4 Yuan M L, Zhang Q L, Zhang L, et al. High-level phylogeny of the Coleoptera inferred with mitochondrial genome sequences. *Mol Phylogenets Evol*, 2016, 104: 99–111

- 5 Timmermans M J T N, Barton C, Haran J, et al. Family-level sampling of mitochondrial genomes in coleoptera: compositional heterogeneity and phylogenetics. [Genome Biol Evol](#), 2016, 8: 161–175
- 6 Bocak L, Barton C, Crampton-platt A, et al. Building the Coleoptera tree-of-life for >8000 species: composition of public DNA data and fit with Linnaean classification. [Syst Entomol](#), 2014, 39: 97–110
- 7 Lawrence J F, Ślipiński A, Seago A E, et al. Phylogeny of the Coleoptera based on morphological characters of adults and larvae. [Ann Zool](#), 2011, 61: 1–217
- 8 Cameron S L. Insect mitochondrial genomics: implications for evolution and phylogeny. [Annu Rev Entomol](#), 2014, 59: 95–117
- 9 Boore J L. Animal mitochondrial genomes. [Nucl Acids Res](#), 1999, 27: 1767–1780
- 10 Simon C, Buckley T R, Frati F, et al. Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA. [Annu Rev Ecol Evol Syst](#), 2006, 37: 545–579
- 11 Wang I J. Recognizing the temporal distinctions between landscape genetics and phylogeography. [Mol Ecol](#), 2010, 19: 2605–2608
- 12 Yuan M L, Zhang Q L, Guo Z L, et al. Comparative mitogenomic analysis of the superfamily Pentatomoidea (Insecta: Hemiptera: Heteroptera) and phylogenetic implications. [BMC Genom](#), 2015, 16: 460
- 13 Yuan M L, Zhang Q L, Guo Z L, et al. The complete mitochondrial genome of *Corizus tetraspilus* (Hemiptera: Rhopalidae) and phylogenetic analysis of Pentatomomorpha. [PLoS ONE](#), 2015, 10: e0129003
- 14 Lowe T M, Eddy S R. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. [Nucl Acids Res](#), 1997, 25: 955–964
- 15 Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. [Mol Biol Evol](#), 2013, 30: 2725–2729
- 16 Perna N T, Kocher T D. Patterns of nucleotide composition at fourfold degenerate sites of animal mitochondrial genomes. [J Mol Evol](#), 1995, 41: 353–358
- 17 Abascal F, Zardoya R, Telford M J. TranslatorX: multiple alignment of nucleotide sequences guided by amino acid translations. [Nucl Acids Res](#), 2010, 38: W7–W13
- 18 Lanfear R, Calcott B, Ho S Y W, et al. Partitionfinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. [Mol Biol Evol](#), 2012, 29: 1695–1701
- 19 Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. New Orleans: Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 2010. 1–8
- 20 Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. [Bioinformatics](#), 2014, 30: 1312–1313
- 21 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. [Syst Biol](#), 2012, 61: 539–542
- 22 Trifinopoulos J, Nguyen L T, von Haeseler A, et al. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. [Nucl Acids Res](#), 2016, 44: W232–W235
- 23 Shimodaira H, Hasegawa M. Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. [Mol Biol Evol](#), 1999, 16: 1114–1116
- 24 Kishino H, Hasegawa M. Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in hominoidea. [J Mol Evol](#), 1989, 29: 170–179
- 25 Shimodaira H. An approximately unbiased test of phylogenetic tree selection. [Syst Biol](#), 2002, 51: 492–508
- 26 Cameron S L, Whiting M F. The complete mitochondrial genome of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, (Insecta: Lepidoptera: Sphingidae), and an examination of mitochondrial gene variability within butterflies and moths. [Gene](#), 2008, 408: 112–123
- 27 Beckenbach A T. Mitochondrial genome sequences of Nematocera (lower Diptera): evidence of rearrangement following a complete genome duplication in a winter crane fly. [Genom Biol Evol](#), 2012, 4: 89–101
- 28 Roberti M, Polosa P L, Bruni F, et al. DmTTF, a novel mitochondrial transcription termination factor that recognises two sequences of *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA. [Nucl Acids Res](#), 2003, 31: 1597–1604
- 29 Hassanin A, Leger N, Deutsch J. Evidence for multiple reversals of asymmetric mutational constraints during the evolution of the mitochondrial genome of Metazoa, and consequences for phylogenetic inferences. [Syst Biol](#), 2005, 54: 277–298
- 30 Ojala D, Montoya J, Attardi G. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. [Nature](#), 1981, 290: 470–474
- 31 Lavrov D V, Boore J L, Brown W M. Complete mtDNA sequences of two millipedes suggest a new model for mitochondrial gene

- rearrangements: duplication and nonrandom loss. *Mol Biol Evol*, 2002, 19: 163–169
- 32 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. *Mol Biol Evol*, 2015, 32: 2302–2316
- 33 Marvaldi A E, Duckett C N, Kjer K M, et al. Structural alignment of 18S and 28S rDNA sequences provides insights into phylogeny of Phytophaga (Coleoptera: Curculionoidea and Chrysomeloidea). *Zool Script*, 2009, 38: 63–77
- 34 Wei S J, Li Q, van Achterberg K, et al. Two mitochondrial genomes from the families Bethyridae and Mutillidae: independent rearrangement of protein-coding genes and higher-level phylogeny of the Hymenoptera. *Mol Phylogenet Evol*, 2014, 77: 1–10
- 35 Mao M, Gibson T, Dowton M. Evolutionary dynamics of the mitochondrial genome in the Evaniomorpha (Hymenoptera)—a group with an intermediate rate of gene rearrangement. *Genom Biol Evol*, 2014, 6: 1862–1874
- 36 Leschen R A B, Lawrence J F, Ślipiński S A. Classification of basal Cucujoidea (Coleoptera: Polyphaga): cladistic analysis, keys and review of new families. *Invert Syst*, 2005, 19: 17–73
- 37 McElrath T C, Robertson J A, Thomas M C, et al. A molecular phylogenetic study of Cucujidae s.l. (Coleoptera: Cucujoidea). *Syst Entomol*, 2015, 40: 705–718

Phylogenetic relationships among superfamilies of Cucujiformia (Coleoptera: Polyphaga) inferred from mitogenomic data

TANG PeiAn¹, LI Min², FENG RunQiu², WANG Juan², LIU ManWen¹, WANG YaZhou¹
& YUAN MingLong²

¹ Collaborative Innovation Center for Modern Grain Circulation and Safety, College of Food Science and Engineering, Nanjing University of Finance and Economics, Nanjing 210023, China;

² State Key Laboratory of Grassland Agro-ecosystems, Lanzhou University; Key Laboratory of Grassland Livestock Industry Innovation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Lanzhou University; College of Pastoral Agriculture Science and Technology, Lanzhou University; Lanzhou 730020, China

Cucujiformia is the largest group in the Polyphaga of the Coleoptera, most of which are of economic importance. Although the monophyly of Cucujiformia has been widely supported, the phylogenetic relationships among seven superfamilies within Cucujiformia remain unresolved. In this study, mitochondrial genomes (mitogenomes) of *Cryptolestes ferrugineus* and *Oryzaephilus surinamensis* were sequenced. Combined with other 67 sequenced coleopteran mitogenomes, we reconstructed phylogenetic relationships among superfamilies of Cucujiformia and evaluated tree topologies by likelihood value tests. The results showed that the complete mitogenome of *C. ferrugineus* was 15497 bp long and encoded 13 protein-coding genes, 22 transfer RNA genes (tRNAs) and two ribosomal genes. The near complete mitogenome of *O. surinamensis* was 13588 bp long and encoded 34 mitochondrial genes, lacking three tRNAs (*trnI*, *trnQ* and *trnM*). General features of the two newly sequenced mitogenomes (gene content, gene arrangement, base composition and codon usage) were highly similar to that of previously sequenced beetles. Phylogenetic analyses based on three mitogenomic data and three analytical methods supported the monophyly of each of five superfamilies (Coccinelloidea, Chrysomeloidea, Curculionoidea, Tenebrionoidea and Cleroidea). The monophyly of Cucujoidea was never recovered in all the nine phylogenetic analyses. Tree topology tests statistically supported the superfamily-level relationships in Cucujiformia: ((Cleroidea+Coccinelloidea)+(Tenebrionoidea+(Cucujoidea (Chrysomeloidea+Curculionoidea)))). Although both mitogenomic datasets and analytical methods have an important impact on tree topologies, mitogenomic data have important implications in evolutionary and phylogenetic studies of Cucujiformia.

mitochondrial DNA, beetles, phylogenetic analysis, maximum likelihood method, Bayesian inference, topology test

doi: [10.1360/N052018-00119](https://doi.org/10.1360/N052018-00119)