

# 基于 18S rDNA 的蝗总科分子系统发育关系研究 及分类系统探讨

刘殿锋, 蒋国芳\*

(南京师范大学生命科学学院遗传资源研究所, 南京 210097)

**摘要:** 将自测的我国直翅目蝗总科 7 科 7 种和从 GenBank 中下载的 17 种直翅目昆虫的 18S rDNA 序列片段进行了同源性比较, 用似然比检验的方法对序列比对结果进行了碱基替代模型的选择, 以蚱总科的 *Paratettix cucullatus* 和蝗总科的 *Stiphra robusta* 作外群, 用 NJ、MP、ML 和贝叶斯法构建了分子系统树。在获得的 1 849 bp 的序列中, 有 205 个变异位点, 74 个简约信息位点; A、T、C 和 G 的碱基平均含量分别为 23.9%、24.3%、23.8% 和 28.0%, 碱基组成基本上无偏异。分子系统树表明: 所研究的内群聚为 4 支, 锥头蝗科、瘤锥蝗科、斑腿蝗科、网翅蝗科、槌角蝗科和剑角蝗科都不是单系。建议将蝗总科分为 4 科, 即锥头蝗科、大腹蝗科、癞蝗科和蝗科。

**关键词:** 直翅目; 蝗总科; 18S rDNA; 分子系统树; 系统发育; 分类系统

中图分类号: Q969 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2005)02-0232-10

## Molecular phylogenetic analysis of Acridoidea based on 18S rDNA with a discussion on its taxonomic system

LIU Dian-Feng, JIANG Guo-Fang\* (Institute of Genetic Resources, College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

**Abstract:** The fragments of 18S rRNA gene were sequenced for 7 species from 7 families of Acridoidea, and the homologous sequences of 17 species of Orthoptera were downloaded from the GenBank data library. After the sequences were aligned, likelihood ratio test was used to find the best model of nucleotide substitution fitting the data obtained from alignment. The molecular phylogenetic trees were reconstructed using *Paratettix cucullatus* of Tetrigoidea and *Stiphra robusta* of Eumastacoidea as outgroups with NJ, MP, ML and Bayesian methods. There were 205 variable sites and 74 parsimony-informative sites in the 1 849 nucleotides of the data, and the relative frequencies of the four nucleotides were approximately equal, which showed that the base compositions were not biased. The molecular phylogenetic trees showed that Acridoidea was divided into four clades, and the present families including Chrotogonidae, Pyrgomorphidae, Catantopidae, Arcypteridae, Gomphoceridae and Acrididae, were not monophyletic. It is suggested that Acridoidea be divided into four families: Pyrgomorphidae, Pamphagidae, Pneumoroidea and Acrididae.

**Key words:** Orthoptera; Acridoidea; 18S rDNA; molecular phylogenetic tree; phylogeny; taxonomic system

蝗总科(Acridoidea)昆虫的科级分类一直是一个存在争议的问题,也是直翅目(Orthoptera)昆虫系统发育研究中的一个热点。多年来,我国蝗虫分类工作者对蝗总科的分类和系统发育做了大量的工作,基于形态特征提出了适合我国蝗虫分类学研究的新分类系统(夏凯龄,1958;印象初,1982;刘举鹏,1991;郑哲民和乔格侠,1998;许升全和郑哲民,1999)现在我国学者一般公认将蝗总科分为 9 个

科,我国分布有 8 个科(郑哲民和乔格侠,1998;许升全和郑哲民,1999;郑乐怡等,1999)。但此分类系统与国外学者所用的分类系统差别较大(Flock and Rowell,1997)给我们与国外的同行进行学术交流带来了很大的障碍,因此有必要进一步从分子水平上探讨蝗总科 9 科的系统发育关系,以期完善蝗总科分类系统提供充足的证据。我国一些学者根据线粒体基因 16S rDNA 和细胞色素 b(Cyt b)从分子水

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30160015)

作者简介:刘殿锋,1975 年出生,男,硕士研究生,研究方向为昆虫分子系统学, E-mail: hn\_ldf.student@sina.com.cn

\* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: cnjgf1208@163.com

收稿日期 Received: 2004-09-14; 接受日期 Accepted: 2005-03-03

平上对蝗总科的系统发育已经作了有益的探讨(任竹梅等, 2002; 印红等, 2003)。

18S rDNA 是真核生物染色体上编码核糖体小亚基 RNA 的基因, 由于 18S rRNA 基因序列及二级结构高度保守, 在蛋白质合成中具有重要的功能, 一般认为它比较适合于研究高级阶元的系统发育(王瑛等, 1999)。许多学者已经将 18S rDNA 序列应用于昆虫分子系统学的研究, 例如, Bourgoign 等(1997)用 18S rDNA 研究了半翅目(Hemiptera)蜡蝉亚目(Fulgoroidea)昆虫的系统发育; 瑞士学者 Flook 和 Rowell 等(1998)测定了 29 种多新翅类(Polyneoptera)昆虫的 18S rDNA 全序列, 并从 GenBank 数据库中下载了 8 种其他昆虫的 18S rDNA 全序列, 重建了传统的古翅亚部(Palaeoptera)和新翅亚部(Neoptera)昆虫的系统发育; Marvaldi 等(2002)将 18S rDNA 序列数据和形态数据相结合, 研究了象甲总科

(Curculionidae)各科之间的系统发育。鉴于 18S rDNA 序列被广泛地用于昆虫的分子系统学研究, 并且在较广的分歧范围内都具有进化信息, Caterino 等(2000)主张将 18S rRNA 和 COI、16S rRNA、EF-1 $\alpha$  作为昆虫分子系统学研究中的标准标记, 以增加同源序列之间的可比性。在本研究中我们共基于 22 种蝗总科昆虫(每个科至少包括 2 个种)和 2 个外群(蚱总科的 *Paratettix cucullatus* 和蝽总科的 *Stiphra robusta*)的 18S rDNA 序列对蝗总科的系统发育进行了重建。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

本实验所用蝗虫标本来源见表 1, 标本均为无水酒精保存, 实验材料均取自蝗虫的后足股节。

表 1 样品及其来源

Table 1 The researched samples and their origin

总科名 Superfamily	科名 Family	种名 Species	编号 Code	GenBank 登录号 GenBank Accession Number	参考文献 References
	蝗总科	癩蝗科			
		笨蝗 <i>Haplotropis brunneriana</i>	h11	AY626904	This Paper
Acridoidea	Pamphagidae	<i>Batrachotetrix</i> sp.	h12	Z97590	Flook PK, 1998
		<i>Glauia terrea</i>	h13	Z97568	Flook PK, 1998
	瘤锥蝗科	印度橄蝗 <i>Tagasta indica</i>	h21	AY626905	This Paper
	Chrotonidae	金澜沧蝗 <i>Mekongiella kingdoni</i>	h22	AY379757	Yin XC, 2004
	锥头蝗科	长额负蝗 <i>Atractomorpha late</i>	h31	AY626906	This Paper
	Pyrgomorphidae	短额负蝗 <i>Atractomorpha sinensis</i>	h32	AY379760	Yin XC, 2004
		锥头蝗 <i>Pyrgomorpha conica</i>	h33	Z97580	Flook PK, 1998
	斑腿蝗科	长翅板胸蝗 <i>Spathosternum prasiniferum prasiniferum</i>	h41	AY626907	This Paper
	Catantopidae	棉蝗 <i>Chondracris rosea rosea</i>	h42	AY379756	Yin XC, 2004
		中华稻蝗 <i>Oxya chinensis</i>	h43	AY037173	Luan YX, 2004
	斑翅蝗科	红翅踵蝗 <i>Pternoscirta sauteri</i>	h51	AY626908	This Paper
	Oedipodidae	亚洲小车蝗 <i>Oedaleus asiaticus</i>	h52	AY379758	Yin XC, 2004
		飞蝗 <i>Locusta migratoria</i>	h53	AF370793	Giribet G, 2001
	网翅蝗科	思茅竹蝗 <i>Ceracris fasciata szemaoensis</i>	h61	AY626909	This Paper
	Arcypteridae	东方雏蝗 <i>Chorthippus intermedius</i>	h62	AY379754	Yin XC, 2004
	槌角蝗科	北京棒角蝗 <i>Dasyhippus peipingensis</i>	h71	AY379753	Yin XC, 2004
	Gomphoceridae	红拟棒角蝗 <i>Gomphocerippus rufus</i>	h72	Z97591	Flook PK, 1998
	剑角蝗科	僧帽佛蝗 <i>Phlaeoba infumata</i>	h81	AY626910	This Paper
	Acrididae	中华蚱蜢 <i>Acrida cinerea</i>	h82	AY379759	Yin XC, 2004
	大腹蝗科	戟尾蝗 <i>Xyronotus aztecus</i>	h91	Z97588	Flook PK, 1999
	Pneumoridae	<i>Bullacris membracioides</i>	h92	Z97562	Flook PK, 1998
	蝽总科	脩蝽科			
		<i>Stiphra robusta</i>	m1	Z97583	Flook PK, 1998
Eumastacoidea	Proscopiidae				
	蚱总科	蚱科			
	Tetrigidae	<i>Paratettix cucullatus</i>	z1	AY338722	Ogden TH, 2004

## 1.2 基因组 DNA 的提取

将保存在无水酒精的标本用无菌双蒸水浸泡 2 天以上,弃双蒸水,剪碎材料,用 SDS/蛋白酶 K 消化液(蛋白酶 K:20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , SDS:1%)消化 8~12 h,酚/氯仿抽提法提取基因组 DNA,溶解在 TE 中,于 -20 $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

## 1.3 PCR 扩增 18S rDNA 片段

PCR 扩增引物设计参照 Flook 和 Rowell(1998) 文献: srDNA-6P (5'-TAAATGATCC-TTCCGCAGG TTCA-3'), ORNP 18S-2 (5'-TTCTGGTTGATCCTG CCAG-3'),引物由上海生工公司合成。每一样品的 PCR 反应总体积为 30  $\mu\text{L}$ ,内含 10 mmol/L Tris (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 0.01% Triton X-100, 1.5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 0.8 mmol/L dNTP, 0.6 mmol/L 引物, 1.5 U Taq 酶以及 1  $\mu\text{L}$  (含 10~25 ng DNA) 模板溶液。为提高反应产物的特异性,PCR 反应运用梯度递减 PCR,共运行 35 个循环,每一个循环包括 95 $^{\circ}\text{C}$  变性 40 s,退火温度由 55 $^{\circ}\text{C}$  降至 50 $^{\circ}\text{C}$ ,每一循环降 0.5 $^{\circ}\text{C}$ ,降至 50 $^{\circ}\text{C}$  后运行 25 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 2 min,在正式循环前进行 95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min,循环完毕 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

## 1.4 PCR 产物的回收及测序

PCR 产物由杭州维特洁生化技术有限公司提供的胶回收试剂盒回收,测序由上海联合基因有限公司完成。测序引物如表 2 所示,其在 18S rDNA 上相应的位置参照 Flook 等(1998)。

表 2 测序引物

Table 2 Sequencing primers

引物 Primer	序列 Sequence
srDNA-6P	5'-TAAATGATCCTTCCGCAGGTTCA-3'
ORNP 18S-2	5'-TTCTGGTTGATCCTGCCAG-3'
18S-M1	5'-CCACCGAATCAAGAAAGAGCTATC-3'
8S-M2	5'-TGTGGTAGCCGTTTCTCAG-3'
118S-P1	5'-ATAACGATACGGGACTCATC-3'
18S-P2	5'-TTCTTGATTCGGTGGGTC-3'

## 1.5 DNA 序列数据的处理及分子系统树的重建

本研究测定了蝗总科 7 科 7 种的 18S rDNA 序列,另从 GenBank 中下载了蝗总科 9 科 15 种以及蚱总科 *Paratettix cucullatus* 和螞总科 *Stiphra robusta* 的 18S rDNA 基因同源序列(表 1),用 Clustal X1.8 对其序列进行比对,其参数设置如下:slow/accurate, gap opening penalty: 15.00, gap extension penalty: 6.66, delay divergent sequences: 30%, DNA transitions

weight: 0.50, negative matrix: OFF, DNA weight matrix: IUB;参照 18S rDNA 的二级结构对比对结果加以校正,并将比对模糊位点切除。利用 Modeltest 3.06 (Posada and Crandall, 1998) 对比对结果进行模型选择,计算相关参数,用 PAUP4.0b10 (Swofford, 2002) 和 MEGA2.1 (Kumar *et al.*, 2001) 分别分析各物种间 18S rRNA 基因的遗传距离和转换颠换值,用邻近法 (Neighbor-joining method, NJ) 最大简约法 (Maximum parsimony, MP) 最大似然法 (Maximum likelihood method, ML) 和贝叶斯法 (Bayesian method) 重建系统发生树。一般认为蚱总科和螞总科与蝗总科有较近的亲缘关系,且较蝗总科原始,但究竟是蚱总科还是蝗总科与蝗总科之间存在姐妹群关系目前不能确定 (Flook and Rowell, 1998; Flook *et al.*, 1999),因此在重建系统发生树时,我们用蚱总科的 *P. cucullatus* 和螞总科的 *S. robusta* 共同作为外群。NJ、ML 和 MP 法应用 PAUP 4.0b10 重建系统发生树,其中 ML 和 MP 法采用启发式搜索, NJ 和 ML 法根据由 Modeltest 3.06 计算得到的结果设置参数, MP 法采用 PAUP4.0b10 默认的参数设置(颠换转换权重比 2:1), NJ 树和 MP 树用 Bootstrap1000 次检验各支的置信度, ML 树用 Bootstrap200 次检验各支的置信度。贝叶斯树用 MrBayes3-0b4 (Huelsenbeck and Ronquist 2001) 软件构建,替换模型参数设置为 nst = 6 (GTR 模型),位点间速率变异设置为 rates = invgamma,同时建立 4 个马尔可夫链,以随机树为起始树,共运行 200 000 代,每 100 代抽样 1 次,重复一次。在舍弃老化样本后,根据剩余的样本构建一致树,并计算相关参数。

## 2 结果

### 2.1 18S rDNA 序列组成及变异

本研究所获得的序列已登录 GenBank 中,序列号为 AY626904 ~ AY626910。所测序列加上从 GenBank 中检索到的 17 种直翅目昆虫的同源序列,经 Clustal X 1.81 软件比对,共有 1 849 个位点(包括 Gap),Mega 的统计结果表明其中有 205 个变异位点,74 个简约信息位点;A、T、C 和 G 的碱基平均含量分别为 23.9%、24.3%、23.8% 和 28.0%,碱基组成基本上无偏异。不同物种序列间碱基替代情况和基于 Tamura-Nei + I + G (G = 0.7732, I = 0.7786) 模型校正后遗传距离如表 3 所示。转换/颠换平均值为 2.38,转换明显高于颠换。遗传距离在外群和内

群之间最小是 2.9% (*S. robusta* 和笨蝗 *H. brunneriana* 之间),最大是 8.8% (*P. cucullatus* 和长额负蝗 *A. late* 之间、*P. cucullatus* 和棉蝗 *C. rosea* 之间),在内群之间最小是 0,即序列相同(短额负蝗

*A. sinensis* 和锥头蝗 *P. conica* 之间,红翅踵蝗 *P. sauteri*、亚洲小车蝗 *O. asiaticus* 和飞蝗 *L. migratoria* 之间),最大是 0.048(棉蝗和长额负蝗之间)。所有序列的平均遗传距离为 0.023。

表 3 24 种直翅目昆虫的 18S rDNA 序列差异歧异(Tamura-Nei + gamma 模型校正,对角线下)及碱基替代(转换/颠换,对角线上)

Table 3 Sequence divergence (Tamura-Nei + gamma model, transitions + transversions, below diagonal) and numbers of substituents (transition/transversion, above diagonal) for mitochondrial 18S rDNA sequences of 24 species of orthopteran insects

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
1 h32		0/0	6/1	9/0	16/10	22/7	24/7	23/7	28/10	29/9	24/8	24/8	24/8	24/8	24/9	25/10	27/21	24/8	23/9	24/10	25/10	23/8	35/22	48/37	
2 h33	0.000		6/1	9/0	16/11	22/7	24/7	23/7	28/10	29/9	24/8	24/8	24/8	24/8	24/9	25/10	27/21	24/8	23/9	24/10	25/10	23/8	35/22	48/37	
3 h21	0.004	0.004		7/1	13/10	18/8	20/8	21/8	23/11	24/10	20/9	20/9	20/9	22/9	22/10	23/11	25/22	22/9	21/10	20/11	21/11	19/9	35/23	42/38	
4 h22	0.005	0.005	0.005		16/10	19/7	21/7	20/7	23/10	22/9	17/8	17/8	17/8	17/8	17/9	18/10	24/21	17/8	16/9	17/10	18/10	16/8	36/22	43/37	
5 h31	0.016	0.016	0.015	0.016		24/15	26/15	26/15	28/18	30/17	24/16	24/16	24/16	25/16	25/17	26/18	33/29	25/16	24/17	24/16	25/18	27/14	42/28	46/48	
6 h11	0.019	0.019	0.017	0.017	0.027		6/0	7/0	15/5	14/7	9/1	9/1	9/1	9/3	9/4	10/3	17/14	11/1	10/2	11/3	10/3	11/3	27/15	41/35	
7 h12	0.021	0.021	0.018	0.018	0.029	0.003		9/0	16/5	17/7	13/1	13/1	13/1	13/3	13/4	14/3	21/14	15/1	14/2	14/3	13/3	13/3	28/15	41/35	
8 h13	0.020	0.020	0.019	0.018	0.029	0.004	0.005		16/5	17/7	12/1	12/1	12/1	10/3	10/4	11/3	18/14	12/1	11/2	14/3	13/3	14/3	29/15	42/35	
9 h91	0.026	0.026	0.022	0.022	0.032	0.012	0.013	0.013		11/5	11/6	11/6	11/6	14/6	14/7	14/8	23/19	13/6	12/7	12/7	11/7	14/7	32/22	39/39	
10 h92	0.026	0.026	0.023	0.020	0.033	0.013	0.015	0.015	0.010		12/8	12/8	12/8	15/8	15/9	15/10	26/21	14/8	13/9	12/8	11/8	13/9	35/21	44/39	
11 h51	0.022	0.022	0.019	0.016	0.028	0.006	0.009	0.008	0.010	0.012		0/0	0/0	2/2	2/3	3/2	14/13	2/0	1/1	2/2	1/2	3/2	31/16	38/34	
12 h52	0.022	0.022	0.019	0.016	0.028	0.006	0.009	0.008	0.010	0.012	0.000		0/0	2/2	2/3	3/2	14/13	2/0	1/1	2/2	1/2	3/2	31/16	38/34	
13 h53	0.022	0.021	0.019	0.016	0.028	0.006	0.009	0.008	0.010	0.012	0.000	0.000		2/2	2/3	3/2	14/12	2/0	1/1	2/2	1/2	3/2	31/16	38/34	
14 h62	0.022	0.022	0.021	0.016	0.029	0.007	0.010	0.008	0.012	0.014	0.002	0.002	0.002		0/1	1/2	12/15	2/2	1/3	4/4	3/4	5/4	29/18	40/36	
15 h71	0.023	0.022	0.021	0.016	0.029	0.008	0.010	0.008	0.013	0.015	0.003	0.003	0.003	0.001		1/3	12/16	2/3	1/4	4/5	3/5	5/5	29/19	40/37	
16 h72	0.024	0.024	0.023	0.018	0.031	0.008	0.010	0.008	0.014	0.016	0.003	0.003	0.003	0.002	0.002		13/15	3/2	2/3	5/4	4/4	6/4	30/18	41/36	
17 h42	0.034	0.034	0.033	0.031	0.048	0.020	0.023	0.020	0.029	0.033	0.017	0.017	0.016	0.017	0.017	0.017		12/13	13/14	16/15	15/15	15/15	32/29	47/47	
18 h61	0.022	0.022	0.021	0.016	0.029	0.007	0.010	0.008	0.012	0.012	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.003	0.003	0.015		1/1	4/2	3/2	5/2	29/16	40/34
19 h81	0.021	0.021	0.020	0.016	0.028	0.007	0.010	0.008	0.012	0.013	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.003	0.003	0.017	0.001		3/3	2/3	4/3	30/17	39/34
20 h41	0.023	0.023	0.020	0.017	0.027	0.008	0.010	0.010	0.012	0.012	0.002	0.002	0.002	0.002	0.005	0.005	0.005	0.020	0.003	0.003		1/2	2/4	33/18	39/37
21 h43	0.024	0.024	0.021	0.018	0.030	0.008	0.010	0.010	0.011	0.011	0.002	0.002	0.002	0.002	0.004	0.005	0.005	0.019	0.003	0.003	0.002		3/4	32/18	39/37
22 h82	0.021	0.021	0.018	0.015	0.029	0.008	0.010	0.011	0.013	0.014	0.003	0.003	0.003	0.003	0.005	0.006	0.006	0.019	0.004	0.004	0.003	0.004		33/17	40/35
23 ml	0.041	0.041	0.042	0.043	0.057	0.029	0.030	0.030	0.039	0.041	0.033	0.033	0.033	0.033	0.034	0.034	0.045	0.031	0.033	0.037	0.036	0.036	-	36/45	
24 zl	0.075	0.075	0.067	0.067	0.088	0.065	0.065	0.065	0.065	0.072	0.059	0.059	0.059	0.065	0.066	0.065	0.088	0.063	0.061	0.063	0.063	0.063	0.063	0.069	

## 2.2 似然比检验和贝叶斯推论给出的模型参数

利用 PAUP 4.0b10 和 Modeltest 3.0 对序列比对结果进行等级似然比检验,结果表明,最适于拟合该数据集的 DNA 进化模型为 TrNef + I + G (Tamura-Nei 1993 with equal base frequencies, restriction of 6ST GTR model) 相关参数共计 10 个,包括模型的似然值自然对数的负值(-lnL)、碱基的频率  $\pi(N)$ 、不变

位点的比例(I)、gamma 分布的形状参数(G)、碱基 X 到 Y 的 6 种替代速率  $R_{XY}$ ,各估计值见表 4,等级似然比检验的结果直接用于 NJ 的距离参数和 ML 的显式模型。利用 MrBayes 软件分析时根据对贝叶斯老化曲线的观察,将开始的 20 000 代作为老化数据舍弃,两次独立贝叶斯分析得到的碱基替代模型参数如表 5 所示。

表 4 等级制似然比检验估计的碱基替代模型参数

Table 4 Nucleotide substitution model parameter estimates for hierarchical likelihood ratio test (hLRT)

-lnL	$\pi(N)$	I	G	$R_{AC}$	$R_{AG}$	$R_{AT}$	$R_{CC}$	$R_{CT}$	$R_{GT}$
4 074.2727	Equal	0.7786	0.7732	1.0000	1.5536	1.0000	1.0000	5.1235	1.0000

## 2.3 分子系统树

本研究中构建的分子系统树除了常用的 NJ、ML 和 MP 法外,还利用了近年新发展起来的系统进化

分析方法——贝叶斯法。NJ、ML 和 MP 树都利用 PAUP 构建,NJ 法和 ML 法构树时模型及参数根据 Modeltest 3.06 的计算结果设置,得到的分子系统树

表 5 两次独立贝叶斯分析得到的碱基替代模型参数  
(上:分析 A;下:分析 B)

Table 5 Nucleotide substitution model parameter estimates for two independent bayesian analyses  
(Upper values in each pair correspond to analysis A ; lower values correspond to analysis B)

参数 Parameter	平均值 Mean	变异 Variance	95% 置信区间 95% Credible Interval	
树长	0.348782	0.212600	0.207000	1.766000
Total tree length (TL)	0.359372	0.208891	0.210000	2.364000
碱基替代速率	1.000000	0.000000	1.000000	1.000000
Rate of substitution $R_{CT}$	1.000000	0.000000	1.000000	1.000000
碱基替代速率	6.055145	3.583672	3.393659	10.382082
Rate of substitution $R_{CT}$	5.910211	3.033792	3.486592	9.803775
碱基替代速率	0.782675	0.151560	0.219074	1.740689
Rate of substitution $R_{CG}$	0.782082	0.086938	0.351400	1.473812
碱基替代速率	0.578207	0.092500	0.176239	1.256993
Rate of substitution $R_{AT}$	0.583610	0.058061	0.224815	1.178533
碱基替代速率	1.346554	0.210498	0.667454	2.457260
Rate of substitution $R_{AG}$	1.312972	0.174684	0.700556	2.331148
碱基替代速率	1.282685	0.222839	0.585735	2.411977
Rate of substitution $R_{AC}$	1.232870	0.173143	0.602717	2.173448
碱基频率	0.237520	0.000092	0.218475	0.256791
Base frequencies $\pi(A)$	0.237520	0.000094	0.217957	0.256008
碱基频率	0.238370	0.000095	0.219485	0.256792
Base frequencies $\pi(C)$	0.239520	0.000093	0.220173	0.257462
碱基频率	0.279900	0.000103	0.260054	0.300182
Base frequencies $\pi(G)$	0.279292	0.000104	0.258377	0.298993
碱基频率	0.244209	0.000090	0.224675	0.261569
Base frequencies $\pi(T)$	0.243668	0.000091	0.226005	0.263234
Gamma 形状参数	0.814001	0.295104	0.181277	2.095546
Shape parameter alpha (G)	0.900167	2.567827	0.129038	2.286361
不变位点比例	0.758338	0.003154	0.635297	0.829739
Pinvar (I)	0.760476	0.002552	0.658485	0.830379

如图 1 和图 2 所示;MP 法构建的分子系统树如图 3 所示,MP 树的一致性指数(Consistency index, CI)为 0.8098,存留指数为(Retention index, RI)为 0.7875,表明整棵树的置信度较高。贝叶斯法得到的分子系统树如图 4 所示。4 种方法得到的分子系统树其聚类结果基本一致,归结起来,可将内群分为 4 个聚类簇,第一个聚类簇包括锥头蝗科 Pyrgomorphidae 的短额负蝗、锥头蝗和长额负蝗,瘤锥蝗科 Chrotogonidae 的印度橄蝗 *T. indica* 和金澜沧蝗 *M. kingdoni*;第二个聚类簇包括大腹蝗科 Pneumoridae 的戟尾蝗 *X. aztecus* 和 *Bullacris membracioides*;第三个聚类簇包括癩蝗科 Pamphagidae 的笨蝗、*Batrachotetrix* sp 和 *Glauia terrea*;第四个聚类簇包括斑腿蝗科 Catantopidae 的长翅板胸蝗 *S. prasiniferum*、棉蝗和中华稻蝗 *O. chinensis*,斑翅蝗科 Oedipodidae 的红翅踵蝗、亚洲小车蝗和飞蝗,网翅蝗科 Arcypteridae 的

东方雏蝗 *C. intermedius* 和思茅竹蝗 *C. fasciata*,槌角蝗科 Gomphoceridae 的北京棒角蝗 *D. peipingensis*、红拟棒角蝗 *G. rufus*,剑角蝗科 Acrididae 的中华蚱蜢 *A. cinerea* 和僧帽蝗 *P. infumata*。

### 3 讨论

#### 3.1 18S rDNA 序列

根据 Mega 软件的统计,24 种直翅目昆虫 18S rDNA 的 4 种碱基 A、T、C 和 G 的平均含量分别为 23.9%、24.3%、23.8% 和 28.0%,表明碱基组成基本上无偏异,与蝗虫的线粒体核糖体基因 16S rDNA 和 12S rDNA 富含 A+T 的碱基组成明显不同(Flock, et al., 1999)。碱基组成偏异对系统发育的重建有很大影响(Lockhart et al., 1994),由于 18S rDNA 的碱基组成无偏异,因此,我们认为本研究中系统发育的重建没有受到碱基组成偏异的影响或影响甚微。

等级似然比检验对本研究中数据集的 DNA 进化模型估计为 TrNef + I + G,这表明不同的核苷酸位点的替代速率并不相同,因位点不同而变化,其原因可能是受 RNA 功能制约,RNA 二级结构上环和茎的替代速率并不相同。不变位点的比例很高,这某种程度上说明 18S rDNA 的高度保守性。

似然比检验和两次独立贝叶斯分析得到的模型参数基本一致,这表明我们构建系统发生树所用的模型及其参数是可靠的。从得到的参数上我们可以看到在 6 种碱基替代类型中 CT 间的转换速率最高,远远高于其它各种替代类型,大于 4 种颠换速率的总和,AG 间的替代速率也高于其它 4 种颠换类型。

Knight 和 Mindel(1993)及陈晓芳等(2003)认为如果转换颠换比的值小于 2.0,此基因序列的突变已达到饱和状态,受进化噪音影响的可能性较大,重建系统发生时如不进行特别加权就可能得出错误信息。本研究转换颠换比平均值为 2.38,大于临界值。另外,经 Tamura-Nei + I + G 模型校正后平均遗传距离仅为 0.023,表明各物种间 18S rDNA 序列分歧不大,因此序列突变达到饱和状态的可能性也不大。基于上述两点原因,我们认为基于 18S rDNA 对蝗总科重建系统发生时受饱和效应的影响较小,构建分子系统树时不必对转换和颠换进行特别的加权。

#### 3.2 构树方法的比较

在分子系统学的研究中,通常用邻接法(NJ)最大简约法(MP)和最大似然法(ML)构建系统发生树。

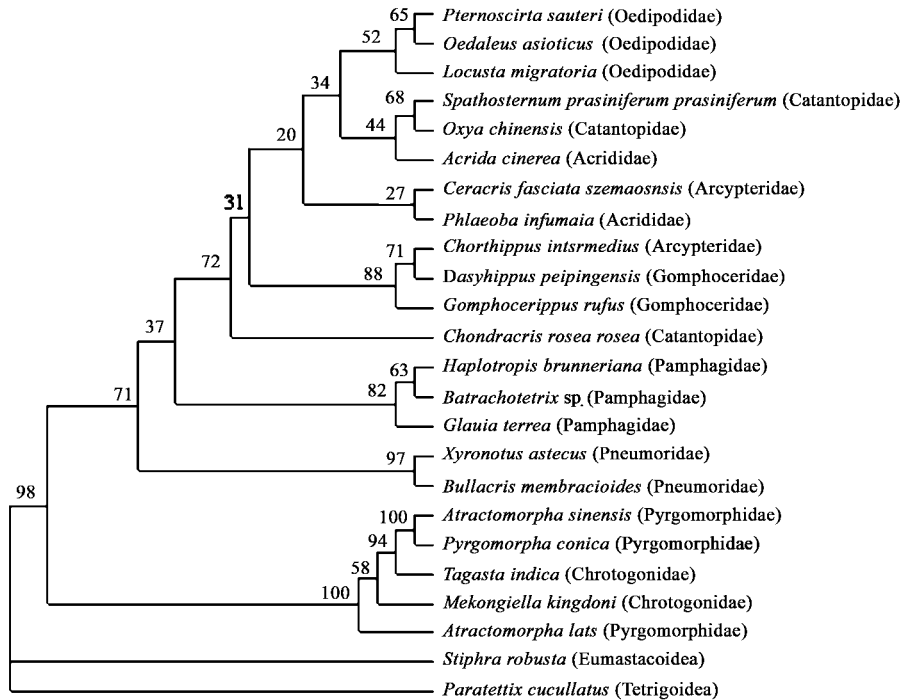


图 1 基于 18S rRNA 基因序列构建的 24 种直翅目昆虫的 NJ 树(图中数字为 1000 次自展检验置信值)

Fig. 1 The neighbor-joining tree resulting from analysis of the 18S rRNA gene sequences of 24 orthopteran insects (Numbers on nodes correspond to percentage bootstrap values for 1000 replicates)

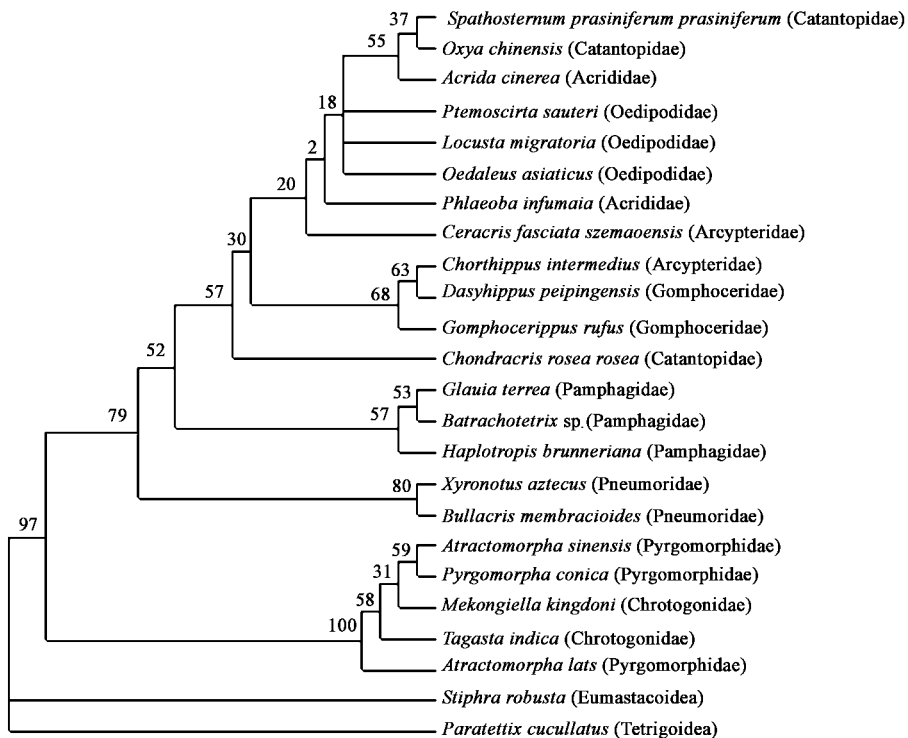


图 2 基于 18S rRNA 基因序列构建的 24 种直翅目昆虫的 MP 树(图中数字为 1000 次自展检验置信值)

Fig. 2 The maximum parsimony tree resulting from analysis of the 18S rRNA gene sequences of 24 orthopteran insects (Numbers on nodes correspond to percentage bootstrap values for 1000 replicates)

这 3 种方法的优劣, 目前尚无公论, 现在公认没有哪一种方法能在所有情况下都优于其他任何方法( Nei

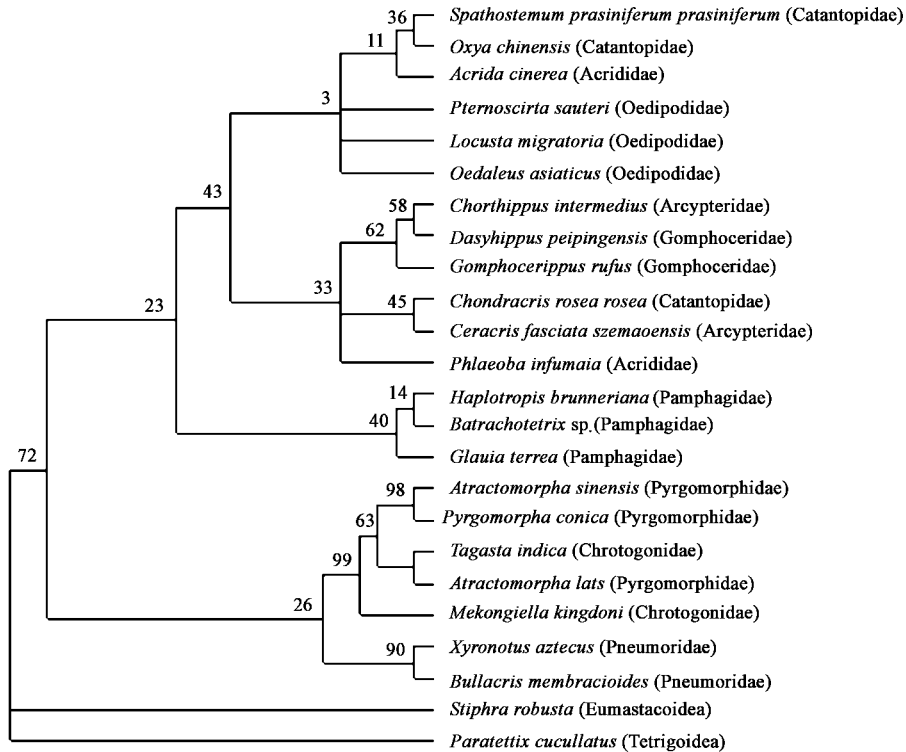


图 3 基于 18S rRNA 基因序列构建的 24 种直翅目昆虫的 ML 树(图中数字为 200 次自展检验置信值)

Fig. 3 The maximum likelihood tree resulting from analysis of the 18S rRNA gene sequences of 24 orthopteran insects (Numbers on nodes correspond to percentage bootstrap values for 200 replicates)

and Kumar., 2000)。许多人认为最大似然法在原理上优于前两种方法,但其计算复杂费时,在处理大数据集样本(即大于 25 个分类单元)时,用此方法几乎不可能。新近提出的贝叶斯法既保留了最大似然法的基本原理,又引进了马尔科夫链的蒙特卡洛方法,使计算时间大大缩短(徐广等, 2003)。本研究中,除了采用前 3 种方法构建了系统树外,也采用贝叶斯法构建了系统发生树,通过对 4 种树的比较我们可以发现,ML 树和贝叶斯树与 NJ 树和 MP 树相比,结果并不理想,大部分节点的自展置信值或后验概率都较低,NJ 树和 MP 树相对要好得多,这可能与 18S rDNA 过于保守,序列间的分歧较低有很大关系。Nei 和 Kumar(2000)认为当序列间的分歧较低、核苷酸数目较大时,MP 树往往能给出更可靠的系统树,我们得到的 MP 树的一致性指数 CI 为 0.8098,存留指数为 RI 为 0.7875,表明整棵树的置信度较高。

### 3.3 蝗总科的系统发育及分类

我国的学者现一般将蝗总科分为 9 个科,我国分布有 8 个科。从我们的研究结果看,并不支持现

今我国学者公认的蝗总科分类系统。

第一个聚类簇中锥头蝗科的短额负蝗、锥头蝗和长额负蝗,瘤锥蝗科的印度橄蝗和金澜沧蝗交替相聚,形成一单系群,并且有较高的 Bootstrap 值和后验概率的支持。因此我们可以排除锥头蝗科和瘤锥蝗科各为单系群的可能性。印红等(2004)用核糖体 18S rDNA 全序体构建的蝗总科分子系统树上锥头蝗科和瘤锥蝗科的科类聚在了一起,其结果也不支持瘤锥蝗科为一单系群。从形态上看,锥头蝗科和瘤锥蝗科头型一般都为锥型,体型一般呈纺锤形,二者的主要区别在于触角不同,瘤锥蝗科的触角为丝状,锥头蝗科的触角为剑状(蒋国芳和郑哲民, 1998)。许升全等(2003)根据 22 个形态学性状对中国分布的瘤锥蝗科和锥头蝗科 10 属蝗虫的系统发育关系进行了支序系统学分析,其结果表明:从支序图来看这 10 个属的关系相互交织在一起,不能区别为两个科。他们认为在蝗虫分类系统中,将锥头蝗科和瘤锥蝗科合在一起作为一个科比较妥当。我国学者印象初根据形态性状,刘举鹏根据蝗卵形态结构都曾经将二者归为一个科——锥头蝗科(印象

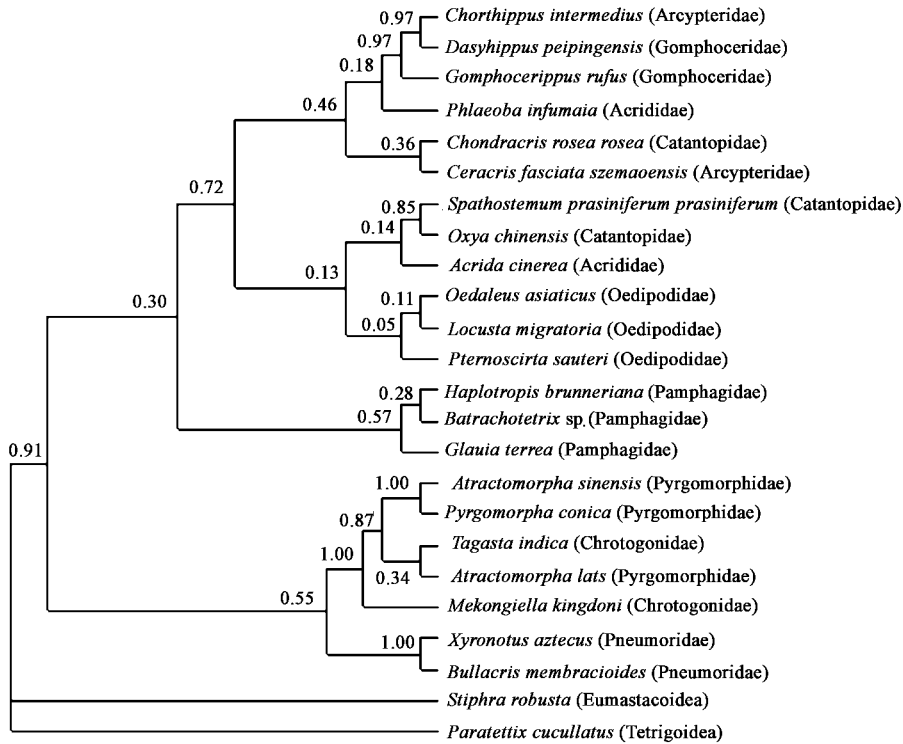


图 4 基于 18S rDNA 基因序列构建的 24 种直翅目昆虫的贝叶斯树(图中数字为后验概率)

Fig. 4 The bayesian tree resulting from analysis of the 18S rDNA gene sequences of 24 orthopteran insects (Numbers on nodes correspond to posterior probability values)

初,1984;刘举鹏,1991)。综合分子和形态方面的证据,我们认为将锥头蝗科和瘤锥蝗科合并为一个科,即锥头蝗科较为合理。

第二个聚类簇包括大腹蝗科的戟尾蝗 *Xyronotus aztecus* 和 *Bullacris membracioides*,第三个聚类簇包括癩蝗科的笨蝗、*Batrachotetrix* sp. 和 *Glauia terrea*,这两个科在 4 棵树上都能聚为独立的两支,和传统的形态证据相一致。国外的学者将大腹蝗科和癩蝗科提升为总科(Flook *et al.*, 1997),Dirsh 根据形态学性状将癩蝗科和锥头蝗科都归入癩蝗总科(Pamphagoidea)(Dirsh *et al.*, 1975)。但从 4 棵分子系统树上看,癩蝗科与锥头蝗科(包括我国的锥头蝗科和瘤锥蝗科)并没有形成一个单系群,这一结果与 Flook 和 Rowell(1997)基于 16S rDNA 和 12S rDNA 序列得到的结果相一致,因此我们不支持将此两科归为一个癩蝗总科。

第四个聚类簇由斑腿蝗科、斑翅蝗科、网翅蝗科、槌角蝗科和剑角蝗科 5 科组成,其中斑腿蝗科、网翅蝗科、槌角蝗科和剑角蝗科在我们构建的 4 种分子系统树中都不是单系群。印红等(2004)的结果也不支持槌角蝗科为一单系群。国外学者现在一般将上述 5 个科的蝗虫都归入一个科,即蝗科

(Acrididae)(Flook and Rowell, 1997)。另一方面,虽然该聚类簇包含的种类繁多,但它们的亲缘关系非常近,例如:斑翅蝗科的红翅踵蝗 *Pternoscirta sauteri* 和网翅蝗科思茅竹蝗 *Ceracris fasciata szemaoensis* 之间的遗传距离仅为 0.001,和槌角蝗科的北京棒角蝗 *Dasyhippus peipingensis* 之间的遗传距离仅为 0.003,和剑角蝗科的僧帽佛蝗 *Phlaeoba infumaia* 仅为 0.001。因此,从进化层次方面来看,这 5 个科分别给予与癩蝗科、锥头蝗科和大腹蝗科相同的分类地位并不适宜。根据上述两方面的原因,还是采用国外学者的观点较为合理,即将上述 5 个科合并为一个科——蝗科。

综上所述,我们建议将蝗总科分为 4 个科,即锥头蝗科 Pyrgomorphidae、大腹蝗科 Pneumoridae、癩蝗科 Pamphagoidea 和蝗科 Acrididae。我国分布除大腹蝗科外的其他 3 个科。对于蝗科科以下阶元的具体划分,应从分子水平进行进一步研究,并与形态数据相互验证,提出更为科学的分类系统。

### 3.4 蝗总科各科的进化关系

任竹梅等(2002)测定了蝗总科 8 个科 10 个种(除斑腿蝗科采用了同一属的 3 种外,其它各科均采用 1 种)的 *Cyt b* 基因部分序列,用 NJ 法构建了分子



系统树,其结果表明:瘤锥蝗科较为原始,而癩蝗科与槌角蝗科关系较近,为比较进化的类群,蝗总科 8 科的进化关系为:瘤锥蝗科→斑翅蝗科和锥头蝗科→斑腿蝗科→剑角蝗科→网翅蝗科→槌角蝗科和癩蝗科。我们的结果也表明瘤锥蝗科是较为原始的一类蝗虫,在这一点上与任等的结果基本一致,但在我们的进化树上瘤锥蝗科和锥头蝗科的物种交替相聚,二者形成一个单系群,锥头蝗科要比斑翅蝗科原始;癩蝗科在我们的系统树上也是较为原始的一个类群,而且癩蝗科和槌角蝗科的关系较远,和任竹梅的结论截然相反。另外,鉴于我们的分子证据不支持斑腿蝗科、网翅蝗科、槌角蝗科和剑角蝗科的单系性,这 4 科及斑翅蝗科的进化关系值得商榷。

印红等(2003,2004)根据线粒体 16S rDNA 序列片段和用核糖体 18S rDNA 全序列构建的蝗总科分子系统树上,锥头蝗科和瘤锥蝗科聚在一起,位于树的基部,是蝗总科内较原始的一个类群;癩蝗科位于瘤锥蝗科、锥头蝗科和另外 5 个科之间,与另外 5 个科相比较为原始。上述结果和我们的结论基本一致。另外,他们的系统树上槌角蝗科和网翅蝗科的种类以较高的置信度聚为一支,我们 4 种系统树上槌角蝗科的北京棒角蝗 *Dasyhippus peipingensis* 和红拟棒角蝗 *Gomphocerippus rufus* 与网翅蝗科的东方雏蝗 *Chorthippus intermedius* 也以很高的置信度聚在一起,这表明这几种蝗虫有很近的亲缘关系,但比较遗憾的是我们的系统树中网翅蝗科的思茅竹蝗 *Ceracris fasciata szemaensis* 并没有和北京棒角蝗、红拟棒角蝗和东方雏蝗聚在一起,因此我们也不能断言槌角蝗科和网翅蝗科有很近的亲缘关系。

刘举鹏(1991)依据蝗卵的表面结构所建立的蝗总科的系统发育、奚耕思(1996)依据精子超微结构所建立的蝗总科的系统发育、郑哲民和乔格侠(1998)在形态学研究的基础上以支序分析建立的蝗总科的系统发育以及许升全和郑哲民(1999)依据雌性下生殖板建立的蝗总科的系统发育的结果都表明,锥头蝗科、瘤锥蝗科、和癩蝗科要比其它科的蝗虫原始(不含大腹蝗科),在这一点上我们的结果与之一致,但就这 3 科的系统发生关系而言并不相同,值得今后进一步研究。

**致谢** 承蒙广西科学院生物研究所曾维铭先生和广西大学农学院刘建文先生协助采集部分蝗虫标本,在此深表谢意!

## 参 考 文 献 (References)

- Bourgoin T, Steffen-Campbell JD, Campbell BC, 1997. Molecular phylogeny of Fulgoromorpha (Insecta, Hemiptera, Archaeorhyncha). The enigmatic Tettigometridae: Evolutionary affiliations and historical biogeography. *Cladistics*, 13: 207–224.
- 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.
- Chen XF, Wang X, Yuan XD, Tang MQ, Li YX, Guo YM, Li QW, 2003. Sequence variation of mitochondrial cytochrome b gene and phylogenetic relationships among twelve species of Charadriiformes. *Acta Genetica Sinica*, 30(5): 419–424. [陈晓芳, 王翔, 袁晓东, 汤敏谦, 李玉祥, 郭玉梅, 李庆伟, 2003. 行形目 12 种鸟类线粒体细胞色素 b 基因序列差异及其系统发育关系. *遗传学报*, 30(5): 419–424.]
- Dirsh VM, 1975. Classification of the Acridomorpha Insects. Claxsey, Farringdon, Oxford.
- Flook PK, Rowell CHF, 1997. The phylogeny of the Caelifera (Insecta, Orthoptera) as deduced from mtrRNA gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 8(1): 89–103.
- Flook PK, Rowell CHF, 1998. Inferences about orthopteroid phylogeny and molecular evolution from small subunit nuclear ribosomal DNA sequences. *Insect Molecular Biology*, 7(2): 163–178.
- Flook PK, Klee S, Rowell CHF, 1999. Combined molecular analysis of the Orthoptera and implications for their higher systematics. *Syst. Biol.*, 48(2): 233–253.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F, 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17: 754–755.
- Jiang GF, Zheng ZM, 1998. Grasshoppers and Locusts from Guangxi. Guilin: Guangxi Normal University Press. 43–58. [蒋国芳, 郑哲民, 1998. 广西蝗虫. 桂林: 广西师范大学出版社. 43–58.]
- Knight A, Mindell DP, 1993. Substitutions bias, weighting of DNA sequence evolution, and the phylogenetic positions of Fea's viper. *Syst. Biol.*, 42(1): 18–31.
- Liu JP, 1991. Preliminary research on the relationships between morphologic construct and phylogeny in grasshoppers. *Articles on Phylogenetic Zoology*, 1: 89–94. [刘举鹏, 1991. 蝗卵形态结构与蝗虫系统发育关系的初步研究. *系统进化动物学论文集*, 1: 89–94.]
- Lockhart PJ, Steel MA, Hendy MD, Penny D, 1994. Recovering evolutionary trees under a more realistic model of sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.*, 11(4): 605–612.
- Marvaldi AE, Sequeira AS, O'Brien CW, Farrell BD, 2002. Molecular and morphological phylogenetics of weevils (Coleoptera, Curculionidae): do niche shifts accompany diversification? *Syst. Biol.*, 51(5): 761–85.
- Nei M, Kumar S, 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press.
- Posada D, Crandall KA, 1998. MODELTEST: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817–818.
- Ren ZM, Ma EB, Guo YP. 2002. Genetic relationships among *Oxya agavis* and other relative species revealed by Cyt b sequences. *Acta Genetica Sinica*, 29(6): 507–513. [任竹梅, 马恩波, 郭亚平, 2002. 山稻

- 蝗及相关物种 Cyt b 基因序列及其遗传关系. 遗传学报, 29(6): 507 - 513 ]
- Wang Y, Chen XF, Liu W, Zhou HZ, Zhao H, 1999. Sequence of the 18S ribosomal RNA gene of cotton boll worm (*Helicoverpa armigera*) and molecular systematics analysis. *Acta Entomologica Sinica*, 42(3): 241 - 247. [王瑛, 陈晓峰, 刘伟, 周红章, 赵珩, 1999. 棉铃虫 18S 核糖体 RNA 基因的序列分析及其分子系统学. 昆虫学报, 42(3): 241 - 247 ]
- Xi GS, 1996. Research on Animal Sperma. Xi'an: Shaanxi Normal University Press. [奚耕思主编, 1996. 动物精子的研究, 西安: 陕西师范大学出版社 ]
- Xia KL, 1958. Taxonomic Essentials on Acrididae in China. Beijing: Science Press. 1 - 239. [夏凯龄, 1958. 中国蝗科分类概要. 北京: 科学出版社. 1 - 239 ]
- XU Guang, FANG QQ, Keirans JE, Durden LA, 2003. Application of Bayesian method for inferring phylogenetic relationships of ticks within the genus *Ixodes*. *Acta Zoologica Sinica*, 49(3): 380 - 388. [徐广, 方庆权, Keirans JE, Durden LA 2003. 分子系统进化关系分析的一种新方法——贝叶斯法在硬蜱属中的应用. 动物学报, 49(3): 380 - 388 ]
- Xu SQ, Li HH, Zheng ZM, 2003. Cladistic study on Chrotogonidae and Pyrgomorphidae from China. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 28(3): 381 - 384. [许升全, 李后魂, 郑哲民, 2003. 中国瘤锥蝗科和锥头蝗科的支序系统学研究. 动物分类学报, 28(3): 381 - 384 ]
- Xu SQ, Zheng ZM. 1999. The study on the phylogenetic relationship of Acridoidea (Orthoptera) based on the female subgenital plate. *Entomotaxonomia*, 21(2): 79 - 83. [许升全, 郑哲民, 1999. 蝗总科昆虫雌性下生殖板及系统发育关系研究. 昆虫分类学报, 21(2): 79 - 83 ]
- Yin H, Li XJ, Wang WQ, Yin XC, 2004. Inferences about Acridoidea phylogenetic relationships from small unit nuclear ribosomal DNA sequence. *Acta Entomologica Sinica*, 47(6): 809 - 814. [印红, 李新江, 王文强, 印象初, 2004. 基于核内核糖体小亚基序列的蝗总科系统发育关系分析. 昆虫学报, 47(6): 809 - 814 ]
- Yin H, Zhang DC, Bi ZL, Yin Z, Liu Y, Yin XC, 2003. Molecular phylogeny of some species of the Acridoidea based on 16Sr DNA. *Acta Genetica Sinica*, 30(8): 766 - 772. [印红, 张道川, 毕智丽, 印展, 刘勇, 印象初, 2003. 蝗总科部分种类 16S rDNA 的分子系统发育关系. 遗传学报, 30(8): 766 - 772 ]
- Yin XC, 1982. On the taxonomic system of Acridoidea from China. *Acta Biologica Plateau Sinica*, 1: 69 - 99. [印象初, 1982. 中国蝗总科 Acridoidea 分类系统的研究. 高原生物学集刊, 1: 69 - 99 ]
- Yin XC, 1984. Grasshoppers and Locusts from Qingzang Altiplano. Beijing: Science Press. [印象初, 1984. 青藏高原的蝗虫. 北京: 科学出版社 ]
- Zheng LY, Gui H, 1999. Insect Classification. Nanjing: Nanjing Normal University Press. 245 - 281. [郑乐怡, 归鸿, 1999. 昆虫分类. 南京: 南京师范大学出版社. 245 - 281 ]
- Zheng ZM, Qiao GX, 1998. Cladistic analysis of the phylogenetic relationships among the families of Acridoidea (Orthoptera: Acridoimorpha). *Acta Zootaxonomica Sinica*, 23(3): 276 - 280. [郑哲民, 乔格侠, 1998. 中国蝗总科昆虫科间系统发育关系支序分析. 动物分类学报, 23(3): 276 - 280 ]

(责任编辑:袁德成)