

基于线粒体 ND2 基因的中国斑翅蝗科部分种类分子系统学研究(直翅目:蝗总科)

丁方美, 黄原*

(陕西师范大学生命科学学院, 西安 710062)

摘要: 本文的目的是通过对斑翅蝗科部分种类的线粒体 ND2 基因进行分析, 重建斑翅蝗科昆虫的系统发育关系, 并探讨分子系统发育关系和传统分类结果的异同。扩增并测定了我国斑翅蝗科 10 属 16 种蝗虫的线粒体 ND2 全基因 1 023 bp 的序列, 对序列的碱基组成、转换颠换、系统发育信号等进行了分析。并基于 ND2 全基因序列数据, 分别采用邻接法(NJ)、最简约法(MP)、最大似然法(ML)和贝叶斯法重建了 10 属 16 种蝗虫的系统发育关系。结果表明: 斑翅蝗科蝗虫 ND2 全基因 A+T 含量平均为 74.6%; 痲蝗亚科和异痲蝗亚科没能得到区分, 建议合并为一个亚科; 而斑翅蝗亚科和飞蝗亚科分类地位还存在争议。

关键词: 斑翅蝗科; ND2 基因; 系统发育; 分子进化

中图分类号: Q965 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2008)01-0055-06

Molecular evolution and phylogenetic analysis of some species of Oedipodidae (Orthoptera: Caelifera) in China based on complete mitochondrial ND2 gene

DING Fang-Mei, HUANG Yuan* (College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: The aim of the present study was to reconstruct the phylogenetic relationships of Oedipodidae and to explore the differences of the results between the phylogenetic relationships and the tradition taxonomy. The ND2 gene complete sequences (1 023 bp) of 10 genera 16 species of Oedipodidae were amplified and sequenced. Nucleotides composition, transition and transversion of this gene were analyzed. By using Neighbor Joining (NJ), Maximum Parsimony (MP), Most Likelihood (ML) and MrBayes (BI) methods, we reconstructed the molecular phylogeny of Oedipodidae based on ND2 gene sequence. The results indicated that average A+T content of ND2 gene in Oedipodidae was 74.6%, showing a strong A+T bias; *Bryodema* and *Bryodemella* were not separated in this study, so we considered it was appropriate to merge them as one subfamily; the status of Oedipodidae and Locustinae was still problematic.

Key words: Oedipodidae; ND2 gene; phylogeny; molecular evolution

斑翅蝗科 Oedipodidae 是蝗虫中非常重要的一个类群, 分布于世界各地。迄今为止, 我国已知 37 属 124 种(夏凯龄和毕道英, 1998)。其中, 有些物种是农业上的重要害虫, 如飞蝗、小车蝗和痲蝗等。传统分类将斑翅蝗科分为 4 个亚科, 分别为飞蝗亚科、痲蝗亚科、异痲蝗亚科和斑翅蝗亚科(夏凯龄和毕道英, 1998)。近年来, 随着分子系统学的发展, 已有学

者利用基因序列重建了斑翅蝗科部分种类的系统发育关系(Lu 和 Huang, 2006), 在此研究中痲蝗亚科和异痲蝗亚科没能得到区分, 认为该合并为一个亚科, 这与传统分类存在很大的分歧。

近年来, 线粒体 DNA(mtDNA)已成为动物分类中应用最广泛的分子标记, 尤其是在低水平的分类中(Avise *et al.*, 1987)。而且, 相对于核基因标记,

基金项目: 国家自然科学基金项目(30470238)

作者简介: 丁方美, 女, 1982 年 5 月生, 浙江安吉人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫分子进化, E-mail: dfm1014@stu.snnu.edu.cn

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: yuanh@snnu.edu.cn

收稿日期 Received: 2007-04-25; 接受日期 Accepted: 2007-08-08

mtDNA 能更快地显示谱系的溯祖,从而一个确定的基于 mtDNA 基因的系统发育关系更能代表有机体真实的系统发育关系(Moore, 1995)。NADH 脱氢酶第二亚基(NADH dehydrogenase subunit 2, ND2)是线粒体电子传递链复合体的组分之一。很多研究表明,与线粒体其他蛋白质编码基因和 rRNA 基因相比,ND2 基因具有更快的进化速率(Near *et al.*, 2003)。许多学者已经将 ND2 基因序列应用于动物分子系统学的研究,但多数是和其他基因联合使用,例如:Nigro 等(1991)联合 ND2 基因部分序列、3 个 rRNA 基因和 CO I 基因部分序列分析了果蝇的系统发育关系;Marks 等(2004)选用 Cyt b 和 ND2 基因片段和完整 ND3 基因对一种小型啄木鸟 *Clyphorynchus spirurus* 各种群间的系统发育关系进行了研究;Dimcheff 等(2002)联合 12S、ND2 和部分 Cyt b 基因序列对鸡形目各亚科间系统发育关系的分析。单独利用 ND2 全基因作为分子标记的也有报道,如 Osborne 等(2002)利用 ND2 全基因序列对 31 种有袋类动物进行了系统发育分析。在这些研究中 ND2 基因显示出其良好的分子标记特性。

本研究扩增并测定了斑翅蝗科 10 属 15 个种的

表 1 实验样本信息及 ND2 基因 GenBank 登录号

Table 1 The information of the researched samples and GenBank accession no. of their ND2 genes

物种编号 No.	属名 Genus	种名 Species	采集地 Collecting location	采集日期 Collecting date	GenBank 登录号 GenBank accession no.
HC02	绿纹蝗属 <i>Aiolopus</i>	花胫绿纹蝗 <i>A. tamulus</i>	海南海口 Haikou, Hainan	2003.10	EF395804
HC03	疣蝗属 <i>Trilophidia</i>	疣蝗 <i>T. annulata</i>	陕西韦曲 Weiqu, Shaanxi	2002.7	EF395803
HC04	小车蝗属 <i>Oedaleus</i>	黄胫小车蝗 <i>O. infernalis</i> Saussure	甘肃临夏 Linxia, Gansu	2001.8	EF395790
HC05		黑条小车蝗 <i>O. decorus decorus</i>	甘肃肃南 Sunan, Gansu	2001.7	EF395792
HC06		红胫小车蝗 <i>O. manjius</i> Chang	陕西柞水 Zhashui, Shaanxi	2002.9	EF395791
HC07	束颈蝗属 <i>Sphingonotus</i>	秦岭束颈蝗 <i>S. tsinlingensis</i>	陕西旬阳 Xunyang, Shaanxi	2002.9	EF395794
HC08		盐池束颈蝗 <i>S. yenchihensis</i>	甘肃永靖 Yongjing, Gansu	2001.8	EF395795
HC16	胫刺蝗属 <i>Compsorhipis</i>	大胫刺蝗 <i>C. davidiana</i>	陕西长安 Chang'an, Shaanxi	2003.9	EF395797
HC25	车蝗属 <i>Gastrimargus</i>	云斑车蝗 <i>G. marmoratus</i>	陕西长安 Chang'an, Shaanxi	2002.8	EF395793
	飞蝗属 <i>Locusta</i>	飞蝗 <i>L. migratoria</i>			NC_001712*
HC15	异痲蝗属 <i>Bryodemella</i>	黄胫异痲蝗 <i>B. holdereri holdereri</i>	甘肃古浪 Gulang, Gansu	2001.8	EF395801
HC11	痲蝗属 <i>Bryodema</i>	青海痲蝗 <i>B. miramae miramae</i>	甘肃天祝 Tianzhu, Gansu	2001.8	EF395799
HC12		白边痲蝗 <i>B. luctuosum luctuosum</i>	甘肃天祝 Tianzhu, Gansu	2001.8	EF395800
HC14		黑翅痲蝗 <i>B. nigroptera</i>	甘肃古浪 Gulang, Gansu	1997.7	EF395802
HC09	皱膝蝗属 <i>Angaracris</i>	鼓翅皱膝蝗 <i>A. barabensis</i>	甘肃夏河 Xiahe, Gansu	2001.8	EF395798
HC10		红翅皱膝蝗 <i>A. rhodopa</i>	甘肃夏河 Xiahe, Gansu	2001.8	EF395796

* 已发表序列 Published data (Flook *et al.*, 1997)

1.2.2 PCR 扩增及产物检测:从 GenBank 下载 *Locusta migratoria*, *Chorthippus parallelus*, *Drosophila melanogaster*, *D. yakuba*, *Anopheles gambiae*, *Triatoma dimidiata* 的 ND2 基因两端相邻序列,利用引物设计软件自动设计出适合扩增 1 100 ~ 1 400 区域的较佳引物对,并对各引物进行各项评估,挑选出最适合的一对,再进行修改加工从而确定本实验所用引物,引

ND2 全基因序列,并在 NCBI 上下载了飞蝗的 ND2 全基因序列,以斑腿蝗科的短角外斑腿蝗 *Xenocatantops brachycerus* 和大斑外斑腿蝗 *X. violaceipes* 为外群,通过 ND2 全基因序列分析,探讨斑翅蝗科一些类群的分类地位,建立斑翅蝗科的分子系统发育关系,为斑翅蝗科昆虫起源与进化关系的研究提供分子生物学方面的证据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用物种的信息详见表 1。所有标本均为无水乙醇固定保存标本,实验取材于蝗虫后足股节肌肉。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取:基因组 DNA 的提取方法参照田英芳等(1999)的提取方法,并在此基础上做了如下改进:1、水浴之前每管样品加入 1 μ L 的 RNA 酶,除去 RNA;2、水浴温度提高到 65 $^{\circ}$ C,时间 2.5 h 以上;3、沉淀时间延长至半小时以上。

物序列为:(1)上游引物:N2-J-163:5'-AATYAAGCTAWTRGGTTCAT-3';(2)下游引物:N2-N-1385:5'-ATAGCGWTARAYTGTAAT-3'。扩增体系总体积为 25 μ L,包括 10 \times 反应缓冲液 2.5 μ L,25 mmol/L MgCl₂ 2.5 μ L,2.5 mmol/L dNTP 2 μ L,10 μ mol/L 上下游引物各 1.5 μ L 5 U/ μ L TaqDNA 聚合酶 0.3 μ L 和 50 ng/ μ L DNA 模板 3 μ L,然后加 ddH₂O 至

终体积 25 μ L。反应程序为:95 $^{\circ}$ C 6 min;之后进行 36 轮循环,循环条件为:94 $^{\circ}$ C 45 s,53 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min;后 72 $^{\circ}$ C 8 min;4 $^{\circ}$ C forever。扩增产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 PCR 产物纯化及测序:PCR 产物原液采用 DNA 凝胶回收试剂盒进行回收,对目的片段进行回收后直接采用四色荧光标记双脱氧链终止法进行测序,测序仪为 ABI 3100 型,对于直接测序效果不好的片段进行克隆测序,克隆测序片段每个片段均测 3 个克隆。

1.3 DNA 序列数据处理

双向测序结果首先进行序列拼接,然后将这些序列输入 Clustal X 1.8 软件进行比对,由于目的序列包括 ND2 全基因和 4 个 tRNA 基因,参照 NCBI 中飞蝗的相应序列,截取 ND2 全基因序列。接着,在 MEGA 3.1 中计算碱基组成、变异位点、保守位点等。最后,在 PAUP* 4.0b10 和 MrBayes V3.0 软件中对数据进行系统发育分析。在整个分析过程中选用本实验室测定的短角外斑腿蝗 *Xenocatantops brachycerus* 和大斑外斑腿蝗 *X. humili* ND2 基因做外群。

2 结果

2.1 DNA 序列组成及变异

包括外群在内的 18 个物种中,除鼓翅皱膝蝗 *Angaracris barabensis*、红翅皱膝蝗 *A. rhodopa* 和疣蝗 *Trilophidia annulata* 3 个物种的 ND2 基因总长为 1 020 bp 外,其余 15 个物种均为 1 023 bp。在 1 023 bp 比对位点中有 578 个变异位点,403 个简约信息位点;A, T, C, G 的含量分别为 40.9%, 33.7%, 15.3% 和 10.1%, A + T 含量为 74.6%, 具有明显的 AT 含量偏向性。转换/颠换的平均值为 1.38, TC 和 AG 转换基本一致,但在颠换中,很明显主要发生 TA 颠换,而 CG 颠换很少发生。

序列分析发现痲蝗属、异痲蝗属和疣蝗属的 5 个种 ND2 起始基因起始密码子不是常见的 ATG,而是 GTG,其余 11 个物种均为 ATG。

2.2 替换饱和与系统发育信号分析

2.2.1 替换饱和性分析:全基因序列密码子第 1, 2, 3 位点的替换饱和性分析(图 1)结果表明:3 个位点颠换饱和程度和第 2 位点的转换饱和程度均不明显(基本呈直线),而第 1 及第 3 位点转换有饱和的趋势(图中可看到一平台)。

2.2.2 系统发育信号分析:在 PAUP* 4.0b10 软件

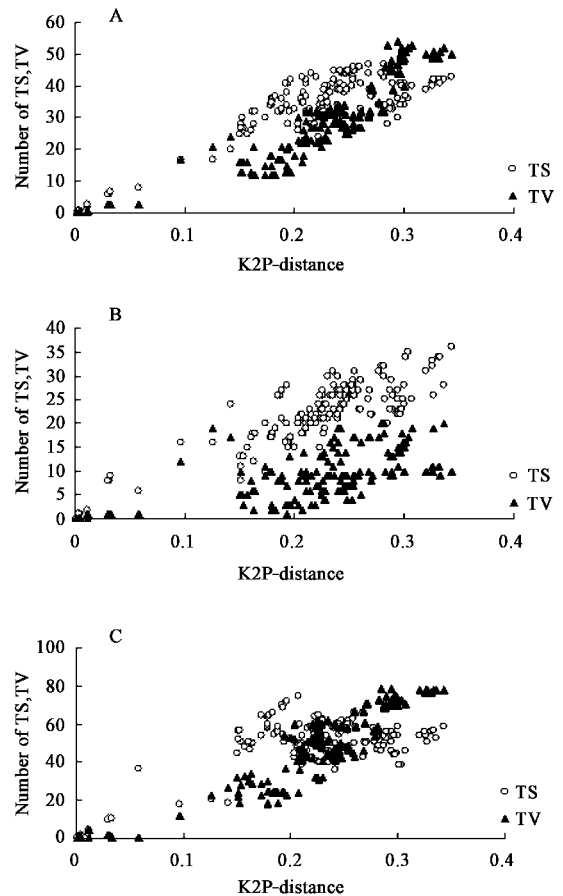


图 1 16 种蝗虫 ND2 基因密码子第 1 (A)、2 (B)、3 (C) 位碱基替换饱和性分析

Fig. 1 Substitution saturation analysis in three codon positions of ND2 gene in 16 studied species
Ts: 转换 Transition; Tv: 颠换 Transversion.

中对数据组进行 g1 检验(随机抽样 10 000 棵树),将所得树长在 Excel 中作图,所得树长分布见图 2,树长分布图强烈左倾,说明该数据组包含较强的系统发育信号。

2.3 系统发育分析

基于 ND2 全基因序列,分别采用邻接法(NJ)、最简约法(MP)、最大似然法(ML)和贝叶斯法(BI)重建了斑翅蝗科的系统发育关系。

前三种方法在 PAUP* 4.0b10 中进行,邻接法分析采用 K2P 距离建树;由于本数据集的平均 R 值为 1.38,根据 Knight 和 Mindell(1993)及陈晓芳等(2003)的观点,此基因序列的突变已达饱和状态,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可能会得出错误的结论,故在用最简约法建树时根据 R 值大小,采取加权 1.4 的策略;最大似然法采用 Modeltest 3.06 中所选出来的最优模型 GTR + I + G 进行建树;并对上述结果进行

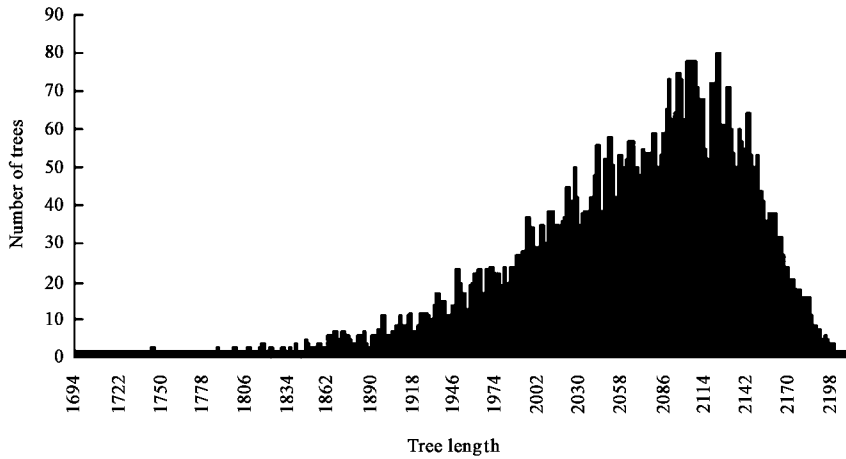


图 2 随机树长分布分析

Fig. 2 Distribution of random tree length

1 000次重复抽样的自举检验。

此三种方法得到的系统发育树拓扑结构基本一致,这里将3棵系统树表示如图3,疣蝗和花胫绿纹蝗的位置在这3个结果中存在争议,且支持度小于50,因此在图上未标明。

贝叶斯法(BI)在MrBayes V3.0软件中完成,运行4个马尔可夫链,共运行150 000代,每10代储存一次树,共得到15 001棵树及其相对的似然值和模型参数。将开始的2 000代作为老化(burnin)数

据舍弃,对剩余的13 001棵树做完全合一树,最终所得到的贝叶斯系统发育树,如图4。

采用4种系统树构建方法得到的系统树拓扑结构基本一致,均可将16种斑翅蝗科物种分为6支:第1支包括小车蝗属的3个物种;第2支包括飞蝗属和车蝗属;第3支包括束颈蝗属的2个物种;第4支包括皱膝蝗属和胫刺蝗属;第5分支包括异痂蝗属和痂蝗属的4个物种;第6分支由绿纹蝗属和疣蝗属的2个物种组成。他们的主要区别就在于疣

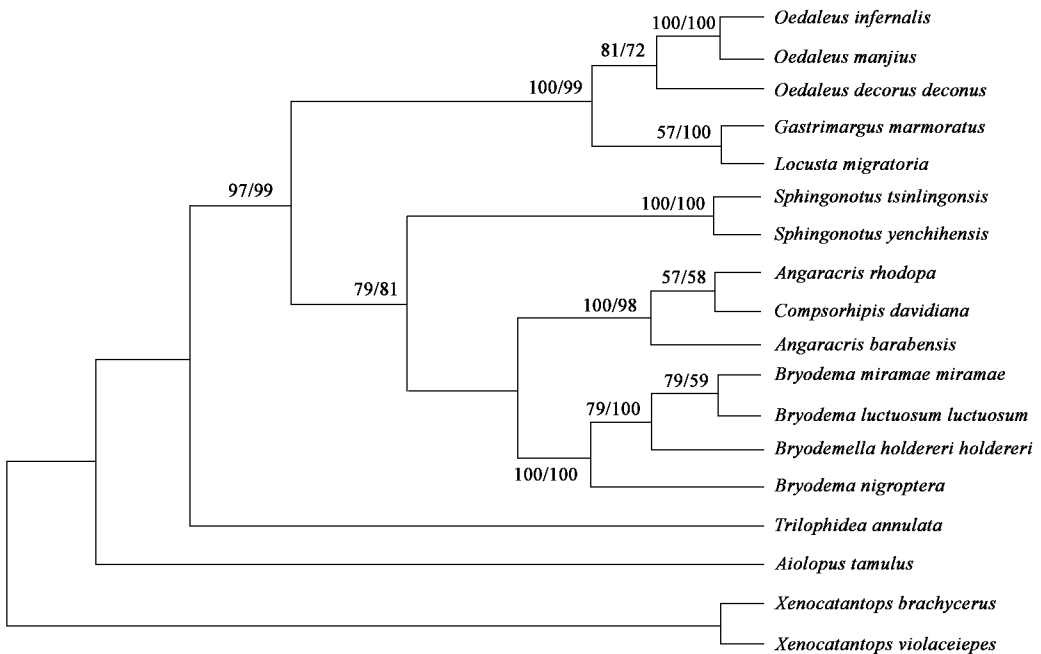


图 3 基于 NJ,MP 和 ML 法所构建的系统树

Fig. 3 Phylogenetic tree of 16 studied species obtained from the methods of NJ, MP and ML. 图 3 上所标数值为邻接法和最简约法的自举值(邻接法/最简约法),最大似然法的自举由于计算量很大,这里未做。

Numbers above the branches indicate the bootstraps of NJ and MP (NJ/MP).

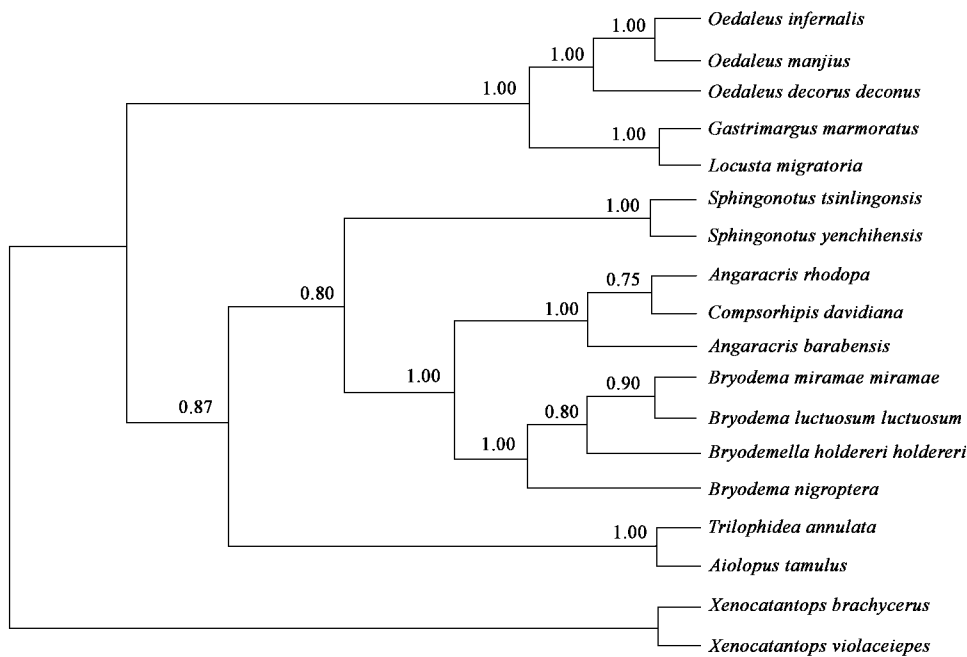


图 4 贝叶斯法构建的 16 种蝗虫的系统树

Fig. 4 Phylogenetic tree of 16 studied species obtained from Bayesian analysis

蝗和花胫绿纹蝗的位置,邻接法中花胫绿纹蝗最早分枝(图 3),而最简约法和最大似然法中最早分支的是疣蝗;而贝叶斯法中疣蝗和花胫绿纹蝗先聚为一支,然后再与其他分支相聚,而且它们的分歧发生在分支 1 2 之后。本结果与斑翅蝗科传统的形态学分类观点相比,既有一致之处,又存在着一定的差异。

3 讨论

在所有的系统树中一致的结果有:(1)第 1 2 分支的关系,车蝗属与飞蝗属是 1 对姐妹群,它们的最近共同祖先与小车蝗属构成姐妹群关系,该结果与王文强等(2004)的支序分析结果一致;(2)分支 3 4 5 的关系,痲蝗亚科痲蝗属与异痲蝗亚科异痲蝗属在本研究中未能得到区分,在所有的系统树中它们的关系均为(((*Bryodema miramae miramae*, *Bryodema luctuosum luctuosum*)*Bryodemella holdereri holdereri*)*Bryodema nigroptera*),且自举支持度较高,此分支与分支 4(痲蝗亚科皱膝蝗属和斑翅蝗亚科大胫刺蝗)相聚,因此本数据集也没能将痲蝗亚科和异痲蝗亚科区分,在 Lu 和 Huang(2006)根据 16S 部分序列构建的系统树中也未能将痲蝗亚科和异痲蝗亚科区分,另外痲蝗属和异痲蝗属还有一个共享的特征是它们的起始密码子不是常见的 ATG 而是

GTG,因此我们考虑将两个亚科合并为一个亚科,同时建议将痲蝗属和异痲蝗属合并为一个属。

本研究中斑翅蝗亚科的地位未能得到解决,此研究中斑翅蝗亚科包括小车蝗属、束颈蝗属、胫刺蝗属、绿纹蝗属和疣蝗属,小车蝗属与飞蝗亚科的两个属构成姐妹群关系,束颈蝗属与痲蝗亚科和异痲蝗亚科的共同祖先相聚,胫刺蝗属与皱膝蝗属形成((*Angaracris rhodopa*, *Compsorhipis davidiana*)*Angaracris barabensis*)的关系,虽然斑翅蝗亚科没如愿自行聚为一支,但此三属在所有的系统树中的位置是一致的,而绿纹蝗属和疣蝗属的位置是本研究结果中分歧最大的两个属,这与 Lu 和 Huang(2006)的结果一致,另外在 Lu 和 Huang(2006)的结果中所有斑翅蝗亚科各属的分布也较凌乱。斑翅蝗科传统亚科分类系统的主要根据是发声器的位置,但分子证据却没能与其很好地吻合,这意味着仅根据发声器的位置来划分斑翅蝗科的亚科分类系统是远远不够的。至于现在所产生的传统分类和分子证据之间的矛盾之处可以通过增加分类单元及 DNA 序列长度等方法来进一步确认。

本研究测定了 ND2 基因的全长,对序列数据组系统发育信号的评估表明虽然存在替换饱和,但系统发育信号较强,4 种方法的系统树在末端分支的高度一致性说明此基因在解决系统树末端分支,即属间、属内种间的关系时能力较强,但可能是因为其

进化较快,在亚科分类水平上的解析力不够。

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 DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 18: 489 – 522.
- 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]
- Dimcheff DE, Drovetski SV, Mindell DP, 2002. Phylogeny of Tetraoninae and other galliform birds using mitochondrial 12S and ND2 genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 24: 203 – 215.
- Flook PK, Rowell CHF, Gellissen G, 1997. The effectiveness of mitochondrial rRNA gene sequences for the reconstruction of the phylogeny of an insect order (Orthoptera). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 8(2): 177 – 192.
- 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.
- Lu HM, Huang Y, 2006. Phylogenetic relationship of 16 Oedipodidae species (Insecta: Orthoptera) based on the 16S rRNA gene sequences. *Insect Science*, 13: 103 – 108.
- Marks BD, Hackett SJ, Capparella AP, 2004. Historical relationships among Neotropical lowland forest areas of endemism as determined by mitochondrial DNA sequence variation within the Wedgebilled Woodcreeper (Aves: Dendrocolaptidae: *Glyphorhynchus spirurus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 24: 153 – 167.
- Moore WS, 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation mitochondrial-gene trees versus nucleargene trees. *Evolution*, 49: 718 – 726.
- Near TJ, Pesavento JJ, Cheng CHC, 2003. Mitochondrial DNA, morphology, and phylogenetic relationships of Antarctic icefishes (Notothenioidae: Channichthyidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 28: 87 – 98.
- Nigro L, Solignac M, Sharp P, 1991. Mitochondrial DNA sequence divergence in the *melanogaster* and oriental species subgroups of *Drosophila*. *J. Mol. Evol.*, 33: 156 – 162.
- Osborne MJ, Christidis L, Norman JA, 2002. Molecular phylogenetics of the Diprotodontia (kangaroos, wombats, koala, possums, and allies). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 25: 219 – 228.
- Tian YF, Huang G, Zheng ZM, Wei ZM, 1999. The easy method of extracting the whole insect genomic DNA. *Journal of Shaanxi Normal University (Natural Science Edition)*, 27(4): 82 – 84. [田英芳, 黄刚, 郑哲民, 魏朝明, 1999. 一种简易的昆虫基因组 DNA 提取方法. *陕西师范大学学报(自然科学版)*, 27(4): 82 – 84]
- Wang WQ, Ying H, 2004. Cladistic analysis of the phylogenetic relationships among 11 genera of family Oedipodidae from China (Orthoptera: Acridoidea). *Journal of Yan'an University*, 24: 62 – 66.
- Xia KL, Bi DY, 1998. Oedipodidae. In: *Fauna Sinica: Insecta. Vol. 10 (Orthoptera Acridoidea: Oedipodidae and Arcypteridae)*. Beijing: Science Press. 132 – 167. [夏凯龄, 毕道英, 1998. 斑翅蝗科. 见: 郑哲民, 夏凯龄等. *中国动物志(昆虫纲第十卷): 直翅目蝗总科: 斑翅蝗科和网翅蝗科*. 北京: 科学出版社. 132 – 167]

(责任编辑: 袁德成)