

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.00597

# 利用线粒体 16S rRNA 基因全序列分析直翅目主要类群的系统发生关系

崔爱明, 黄原

陕西师范大学生命科学院, 西安 710062

**摘要:** 为了构建稳健的直翅目主要类群间的系统发生关系并探讨 16S rRNA 基因序列在构建直翅目昆虫不同分类阶元系统发生关系时的可行性、功效以及性能, 文章测定了直翅目 4 总科 9 科 18 种昆虫的 16S rRNA 基因全序列, 联合已知该基因全序列的其他 40 种昆虫, 构建了直翅目主要类群之间的系统发生关系, 并分析了 16S rRNA 基因全序列的系统发生性能和功效。结果表明, 直翅目昆虫的 16S rRNA 基因全长平均为 1 310 bp; 除生活方式特化的蚤蛄总科和蝼蛄总科的地位无法确定外, 直翅目其他主要类群系统发生关系比较稳定; 蝗总科下除了斑翅蝗科和槌角蝗科外, 剑角蝗科、斑腿蝗科、网翅蝗科都不是单系群, 且用不同的方法构建的系统发生树中聚类情况完全一致, 各科间遗传距离差异不大, 建议将其合为一科; 锥头蝗科、瘤锥蝗科和癞蝗科间的遗传距离差异也不大; 在构建系统发生树时, 16S rRNA 基因环区的信息量要比茎区的大; 16S rRNA 基因可以构建可靠的直翅目属与种水平和目与亚目高级阶元的系统发生关系, 但对科和总科阶元缺乏足够的分辨力。

**关键词:** 直翅目; 16S rRNA; 系统发生

## Phylogenetic relationships among Orthoptera insect groups based on complete sequences of 16S ribosomal RNA

CUI Ai-Ming, HUANG Yuan

College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

**Abstract:** In order to reconstruct a robust phylogenetic relationship among major groups of Orthoptera and to explore the phylogenetic utility and performance of 16S Ribosomal RNA gene, complete sequences of 16S Ribosomal RNA were sequenced from 18 species in 9 families and 4 superfamilies of Orthoptera, and analyzed with other 40 species that have been completely sequenced. The result showed that the average length of 16S Ribosomal RNA was 1 310 bp. The positions of Tridactuloidea and Gryllotalpidae in Orthoptera were uncertain based on the 16S rRNA data, and the phylogenetic relationships of other major groups in Orthoptera were rather robust. Except for Oedipodidae and Gomphoceridae, Acrididae, Catantopidae, and Arcypteridae in Xia's taxonomic system were not monophyletic groups, and the genetic distances among the five groups were small. This indicates that the five families should be combined into one family. The genetic distances

收稿日期: 2011-11-23; 修回日期: 2012-01-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30970346, 31172076)和中央高校基本科研业务费专项资金(编号: GK201001004)资助

作者简介: 崔爱明, 硕士研究生, 专业方向: 分子系统学。Tel: 029-85310271; E-mail: cs888.happy@163.com

通讯作者: 黄原, 教授, 博士生导师, 研究方向: 分子进化与分子系统学。E-mail: yuanh@snnu.edu.cn

网络出版时间: 2012-4-11 10:40:52

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20120416.1554.004.html>

among Pamphagidae, Chrotonidae, and Pyrgomorphidae were also small. The loops of 16S rRNA gene could provide more information than stems when they were used for phylogenetic analysis. Complete sequence of 16S rRNA gene can be used to reconstruct robust phylogenetic relationship at the taxonomic category of species, genera, and suborder in Orthoptera, but lack of resolution at family and superfamily levels.

**Keywords:** Orthoptera; 16S rRNA; phylogeny

直翅目(Orthoptera)是昆虫纲中起源较早的类群之一,由距今约 3 亿年前上石炭纪的原直翅类(Protorthoptera)演化形成<sup>[1,2]</sup>。全世界已知有 20 000 种以上<sup>[3]</sup>。自 1789 年 Oliver 建立了广义的直翅目开始至今,国内外很多学者对直翅目昆虫的分类和系统发育关系做了大量工作,提出了多种分类系统。虽然国内外都将直翅目分为蝗亚目和螞亚目,但在低级阶元的分类问题上一直存在争议,这对国内外研究者进行学术交流带来了很大的障碍。

随着分子生物学技术的迅速发展,在分子水平上对物种系统发生关系的界定已经很普遍,线粒体基因组尤其是 rRNA(即 12S rRNA 和 16S rRNA)被广泛应用于昆虫物种的鉴定与系统发生中<sup>[4-7]</sup>。16S rRNA 基因作为系统发生标记的主要优点是序列中既包括进化保守区,也包括异变区,在不同的结构区段有着不同的进化速率,这对远古和现存生物的系统发生事件都有潜在的解析能力,一般认为它比较适合用于属、种间的系统发育分析<sup>[8-10]</sup>。另外,二级结构包含的茎环结构在每个物种间有所差异,因此二级结构的比对以及预测对于研究物种间的系统发生关系也有着极为重要的意义<sup>[11-13]</sup>。

目前利用 16S rRNA 基因构建直翅目下蝗亚目和螞亚目主要类群系统发生关系的研究均采用的是部分序列<sup>[14-16]</sup>,基于 16S rRNA 基因全长序列探讨整个直翅目系统发育关系和分歧时间的研究尚未有报道。本研究中分析了 58 种直翅目昆虫(蝗亚目 40 种,螞亚目 18 种)以及 3 种外群的 16S rRNA 基因全序列的一级结构和二级结构,就 16S rRNA 基因序列用于直翅目昆虫不同分类阶元上的可行性、功效以及性能等做了评价;对不同的比对和建树方法做了比较;对直翅目中分类地位有争议的几个类群进行了探讨,重建了直翅目主要类群间的系统发生关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料及来源

本研究测定了直翅目 4 总科 9 科 18 种昆虫的 16S rRNA 序列,各个种的分类地位、GenBank 登录号见表 1。从 GenBank 下载了直翅目 10 总科 21 科共 40 种昆虫的 16S rRNA 序列,同时下载竹节虫目、等翅目和蜚蠊目各一个种的 16S rRNA 同源序列作为外群,序列信息见表 2。提取 DNA 的凭证标本均保存于陕西师范大学生命科学学院分子进化生物学实验室。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 总 DNA 提取、PCR 扩增与测序

取昆虫的后股节,用无菌水冲洗,剪开外骨骼取出肌肉放入加有 600  $\mu$ L 匀浆缓冲液的 1.5 mL 离心管中(缓冲液:0.05 mol/L Tris, 0.1 mol/L NaCl, 0.1 mol/L EDTA, pH7.0~8.0, 5% SDS, 50 ng 蛋白酶 K),剪碎并研磨。60 $^{\circ}$ C 水浴 2.5~3 h。用 Tris 饱和酚及氯仿-异戊醇抽提法提取基因组 DNA,最后用-20 $^{\circ}$ C 预冷的无水乙醇及 70%乙醇提纯、洗涤后真空干燥;40~50  $\mu$ L 无菌双蒸水溶解。经 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测,-20 $^{\circ}$ C 长期保存备用。

以提取的总 DNA 为模板,基于长距 PCR 扩增出全线粒体基因组并测序,再从全线粒体基因组序列中抽取 16S rRNA 基因全序列。反应体系 50  $\mu$ L:模板 DNA 1~3  $\mu$ L、10 $\times$ buffer 2.5  $\mu$ L、dNTP(2.5 mmol/L)2  $\mu$ L、25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2.5  $\mu$ L,上下游引物(10 pmol/L)各 2  $\mu$ L、5 U/ $\mu$ L TaqDNA 聚合酶 0.2  $\mu$ L,加 ddH<sub>2</sub>O 补足。扩增条件:94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 53~58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,于-20 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物用百泰克公司 DNA 胶

表 1 标本信息

目/总科	科	种名	GenBank 登录号	采集地	
螽亚目/蟋蟀总科	蟋蟀科(Gryllidae)	银川油葫芦( <i>Teleogryllus infernalis</i> )	JQ067635	河北蔚县	
		多伊棺头蟋( <i>Loxoblemmus doenitzi</i> )	JQ065108	河北保定	
螽亚目/螽斯总科	蝈蝈科(Eneopteridae)	云斑金蟋( <i>Xenorhyllus marmoratus</i> )	JQ067636	河北保定	
		中华囊螽( <i>Atlanticus sinensis</i> )	JQ065099	河北保定	
		暗褐蝈螽( <i>Gampsocleis sedakovii</i> )	JQ065104	河北涿鹿	
蝗亚目/蝗总科	网翅蝗科(Arcypteridae)	青脊竹蝗( <i>Ceracris nigricornis nigricorn</i> )	JQ065102	湖北神农架	
		理塘白纹蝗( <i>Leuconemacris litangensis</i> )	JQ067633	四川理塘	
		小卵翅蝗( <i>Caryanda elegans</i> )	JQ065101	云南勐腊县	
	斑腿蝗科(Catantopidae)	紫胫长夹蝗( <i>Choroedocus violaceipes</i> )	JQ065103	云南普洱市	
		斑角蔗蝗( <i>Hieroglyphus annulicornis</i> )	JQ065105	浙江杭州	
		霍山蹦蝗( <i>Sinopodisma houshana</i> )	JQ065109	陕西柞水	
		斑腿勐腊蝗( <i>Menglacris maculata</i> )	JQ067634	云南勐腊县	
		柯氏无翅蝗( <i>Zubovskia koeppeni</i> )	JQ065111	黑龙江二道白河	
		剑角蝗科(Acrididae)	云南卡蝗( <i>Carsula yunnana</i> )	JQ065100	云南宁洱
		癞蝗科(Pamphagidae)	友谊华癞蝗( <i>Sinotmethis amicus</i> )	JQ067632	新疆温泉
			笨蝗( <i>Haplotropis brunneriana</i> )	JQ065106	黑龙江加格达奇
		瘤锥蝗科(Chrotogonidae)	云南蝗( <i>Yunnanites coriacea</i> )	JQ065110	云南勐腊
		蝗亚目/蝻总科	脊蝻科(Chorotypidae)	变色乌蝻( <i>Erianthus versicolor</i> )	JQ065107

回收试剂盒进行回收纯化。引物合成及测序由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

### 1.2.2 序列拼接、比对和遗传距离计算

测序结果用 Staden Package 2.0<sup>[17]</sup> 软件包中的 Pregap4 进行拼接, 将注释获得的 16S rRNA 序列保存为 fasta 格式, 反向序列用 DNASTar 5.0<sup>[18]</sup> 软件包中的 EditSeq 进行校正。所有序列用 MAFFT<sup>[19]</sup> 和 ClustalX2<sup>[20]</sup> 两种软件以默认参数进行多重序列比对。利用 MEGA5.0<sup>[21]</sup> 对序列集的碱基组成、保守位点、变异位点、简约信息位点以及自裔位点等进行分析; 依据现行形态学的分类将所有研究类群按总科和科划分成组, 基于 K2P 距离计算各总科以及科之间的遗传距离。

用已经预测出的疑钩顶螽(*Ruspolia dubia*)<sup>[22]</sup> 和短额负蝗(*Atractomorpha sinensis*)<sup>[23]</sup> 的 16S rRNA 二级结构为基础, 借助 ClustalX2 的比对结果对所有类群的 16S rRNA 二级结构进行分析。

### 1.2.3 模型选择和系统发生分析

将 MrModeltest 2.2<sup>[24]</sup> 和 MrMTgui<sup>[25]</sup> 软件结合, 估算出数据集的最佳模型为 GTR+I+G 模型, 模型及相关参数用于后续的系统发生分析。分别利用

PhyML3.0<sup>[26]</sup>、RAxML<sup>[27]</sup>、PAUP\*4.0b10<sup>[28]</sup>、MrBayes v3.0b4<sup>[29]</sup> 以及 TreeFinder<sup>[30]</sup> 构建物种间的系统发生关系。

MrBayes v3.0b4 中利用贝叶斯推论法(Bayesian Inference method, BI)重建系统树时以 MrModeltest 2.2 选出的最优模型 GTR+I+G 为进化模型, 采用马尔科夫链的蒙特卡洛 (Markov Chain Monte Carlo, MCMC) 方法, 以随机树为起始树, 4 条马尔科夫链 (1 条冷链 3 条热链) 运行 200 万代, 每 100 代取样 1 次, 运算开始的 2 000 个样本作为老化样本舍弃, 构建一致树并获得各分支的后验概率(Posterior probability, PP)。

PhyML3.0 和 TreeFinder 中以用于核苷酸序列的 HKY85 为模型, 以默认的快速 NNI 方法对树的最佳拓扑结构和分支长度进行分析, 进行 1 000 次自举检验, 重建最大似然树。

在 RAxML 中以命令“-fa”指定执行快速支持度分析, 并在一次单独的程序运行中搜索最佳分值(best-scoring)的 ML 树, 以随机种子数启动快速支持度计算(Rapid bootstrap analysis), GTRGAMMA 为模型, 竹节虫目为外群, 进行 1 000 次自举检验。

在 PAUP\* 4.0b10 中利用最大似然法(Maximum

表 2 从 NCBI 中下载的 16S rRNA 基因序列信息

分类地位	科	种名	GenBank 登录号	
螽亚目/螽蛄总科	螽蛄科 (Gryllotalpidae)	<i>Gryllotalpa orientalis</i>	NC_006678	
		<i>Gryllotalpa pluvialis</i>	NC_011302	
螽亚目/蟋蟀总科	蟋蟀科 (Gryllidae)	<i>Teleogryllus emma</i>	NC_011823	
		<i>Myrmecophilus manni</i>	NC_011301	
螽亚目/驼螽总科	驼螽科 (Bradyporidae)	<i>Troglophilus neglectus</i>	NC_011306	
螽亚目/螽斯总科	露螽科 (Phaneropteridae)	<i>Elimaea cheni</i>	NC_014289	
	草螽科 (Conocephalidae)	<i>Ruspolia dubia</i>	NC_009876	
		<i>Conocephalus maculatus</i>	HQ711931	
	硕螽科 (Bradyporidae)	<i>Deracantha onos</i>	NC_011813	
	螽斯科 (Tettigoniidae)	<i>Anabrus simplex</i>	NC_009967	
		<i>Gampsocleis gratiosa</i>	NC_011200	
蝗亚目/蝗总科	网翅蝗科 (Arcypteridae)	<i>Arcyptera coreana</i>	NC_013805	
		<i>Chorthippus chinensis</i>	NC_011095	
		<i>Euchorthippus fusigeniculatus</i>	NC_014449	
	槌角蝗科 (Gomphoceridae)	<i>Gomphocerippus rufus</i>	NC_014349	
		<i>Gomphocerus licenti</i>	NC_013847	
		<i>Gomphocerus sibiricus tibetanus</i>	NC_015478	
		<i>Traulia szetschuanensis</i>	NC_013826	
	斑腿蝗科 (Catantopidae)	<i>Schistocerca gregaria gregaria</i>	NC_013240	
		<i>Ognevica longipennis</i>	NC_013701	
		<i>Calliptamus italicus</i>	NC_011305	
		<i>Prumna arctica</i>	NC_013835	
		<i>Oxya chinensis</i>	NC_010219	
		<i>Xyleus modestus</i>	NC_014490	
		剑角蝗科 (Acrididae)	<i>Acrida willemsei</i>	NC_011303
			<i>Phlaeoba albonema</i>	NC_011827
			<i>Acrida cinerea</i>	NC_014887
		斑翅蝗科 (Oedipodidae)	<i>Gastrimargus marmoratus1</i>	NC_011114
	<i>Gastrimargus marmoratus2</i>		EU527334	
	<i>Oedaleus decorus asiaticus</i>		NC_011115	
	<i>Locusta migratoria migratoria</i>		NC_011119	
<i>Locusta migratoria</i>	NC_001712			
<i>Locusta migratoria manilensis</i>	NC_014891			
锥头蝗科 (Pyrgomorphidae)	<i>Atractomorpha sinensis</i>	NC_011824		
瘤锥蝗科 (Chrotogonidae)	<i>Mekongiana xiangchengensis</i>	NC_014450		
	<i>Mekongiella xizangensis</i>	NC_014451		
癞蝗科 (Pamphagidae)	<i>Thrinchus schrenkii</i>	NC_014610		
大腹蝗科 (Pneumoroidae)	<i>Physemacris variolosa</i>	NC_014491		
直翅目/蚤蛄总科	蚤蛄科 (Tridactylidae)	<i>Ellipes minuta</i>	NC_014488	
直翅目/蝼蛄总科	枕蝼蛄科 (Episactidea)	<i>Pielomastax zhengi</i>	JF411955	
蜚蠊目		<i>Blattella germanica</i>	EU854321	
等翅目		<i>Reticulitermes hageni</i>	EF206320	
竹节虫目		<i>Ramulus hainanense</i>	FJ156750	

likelihood method, ML)和最大简约法(Maximum Parsimony method, MP)重建系统发生树; 并进行 g1 检验和树长分布分析; 构建 ML 树时进行 100 次重复抽样的自举检验, 设置进化模型类型为 6 (nst=6), 位点间的速率模型为  $\gamma$  分布(Rates=gamma); 构建 MP 树时根据对 16S rRNA 二级结构比对结果划分茎、环区, 并对茎区赋权 0.6, 环区赋权 1, 以竹节虫目为外群, 进行 1 000 次自举检验。

使用 TreeRot.v3<sup>[31]</sup>联合 PAUP\* 4.0b10 对划分的茎、环区 2 个数据集各自的系统发生信号进行评估。先将在 PAUP 中重建的加权 MP 合一树保存在 TreeRot.v3 程序所在的文件夹下, 后将其导入 TreeRot.v3, 生成一限制树文件; 将该文件在 PAUP\* 4.0b10 运行后得到 log 文件; 再次将 log 文件导入 TreeRot.v3 中计算出衰退/支持指数 (Partitioned Bremer support indices, PBS), 来衡量分歧和分支支持度。

## 2 结果与分析

### 2.1 序列组成和遗传距离

在直翅目中 16S rRNA 基因的长度从 *Gryllotalpa pluvialis* 的 1 236 bp 到 *Conocephalus maculatus* 的 1 345 bp 不等, 其平均长为 1 310 bp。用 ClustalX2 比对后的总长度为 1 475 bp, 而用 MAFFT 比对后的总长为 1 531 bp, 与前者相比 MAFFT 加入的空位要明显增多; 用不同的建树方法对两者比对生成的文件构建系统发生树时发现, ClustalX2 生成的文件构建的系统树有较好的解析度, 因此之后的数据都将采用 ClustalX2 的比对结果进行统计。

利用 MEGA5.0<sup>[20]</sup>基于 K2P 模型计算了 7 个总科之间、20 个科之间以及包括两个物种以上的 10 个科科内物种间的遗传距离。直翅目 7 个总科间的遗传距离在 0.233%~0.438% 之间, 平均遗传距离为 0.353%; 20 个科之间的遗传距离在 0.063%~0.441% 之间, 平均遗传距离为 0.295%, 其中蚤螋科与直翅目其他科之间的距离偏大, 在 0.347%~0.441% 之间; 剑角蝗科、斑腿蝗科、斑翅蝗科、网翅蝗科及槌角蝗科 5 科间的遗传距离均小于 0.18%, 其中网翅蝗科及槌角蝗科的距离最近, 为 0.08%, 其他各科间的遗传距离没有明显的规律。包括两个物种以上的 11 个科内物种间的遗传距离除了蟋蟀科的遗传距离为

0.246% 外, 其余各科间的遗传距离均小于 0.2%。蝗亚目下蝗总科与螞总科之间的距离为 0.247%, 与蚤螋总科之间的距离为 0.389%; 而螞总科与蚤螋总科之间的距离为 0.409%; 蚤亚目下蝼蛄总科与蟋蟀总科、螞斯总科、驼螞总科的距离分别是 0.385%、0.399%、0.370%。从结果可以看出, 总科间与种内除蟋蟀科外的遗传距离没有交集, 与科间的遗传距离都有交集, 且蚤螋与其他直翅目类群的距离明显较远。

### 2.2 二级结构比较

比对后可以看出不同物种的 16S rRNA 基因在一级结构上都存在碱基转换、颠换和短片段的插入或缺失, 其中插入和缺失特别明显的有: 疑钩顶螞在 860~890 bp 之间有 30 bp、东方蝼蛄和 *Gryllotalpa pluvialis* 在 1048~1072 之间有 34 bp、郑氏比螞和 *Ellipes minuta* 在 164~184 之间有 20 bp 的缺失, 黄脸油葫芦、多伊棺头螞和银川油葫芦在 390~400 之间有 10 bp、*Physemacris variolosa* 在 480~495 之间、*Troglophilus neglectus* 在 735~750 之间和乡城湄公蝗在 929~941 bp 之间有 15 bp 的插入。以疑钩顶螞和短额负蝗的 16S rRNA 二级结构为基础, 借助 ClustalX2 的比对结果预测二级结构, 显示二级结构极为相似, 都包括 6 个结构域(结构域 III 缺失), 但每个结构域中茎环结构的数量各异, 这种差异主要是各物种间内环、发卡环以及内环与发卡环之间碱基对数目的不同, 所有茎环结构在 49 个左右。

一般认为环区的进化速率要比茎区的进化速率快, 但是从本研究的结构来看并非如此, 在结构域 II、IV 和 VI 区存在的差异最大, 但在这几个区的保守位点也最多: 分别在 205~230 之间约 25 bp, 355~365 之间约 15 bp, 660~675 之间约 15 bp, 725~737 之间约 12 bp, 835~862 之间约 27 bp, 890~912 之间约 20 bp, 960~1020 之间约 60 bp, 1085~1097 之间约 12 bp, 1245~1255 之间约 10 bp, 以及 1400~1412 之间约 12 bp 长的序列相对保守, 而在 760~775 之间约 15 bp, 1185~1210 之间约 25 bp, 1332~1375 之间约 43 bp 长的序列高度保守。这些保守位点既有环区也有茎区, 前面提到在一级结构上的序列片段的插入或缺失也都在 II、IV 和 VI 区。

### 2.3 系统发生关系

以两种不同软件的比对结果分别用最大似然法

(ML)和贝叶斯法(BI)构建系统树(图 1, 图 2)。从重建的系统树来看,蝗亚目和蝻亚目的聚类情况与从形态学和生理结构角度进行的分类基本一致,但也

存在一些差异。

重建的所有树均将直翅目分成两支,而且蝻亚目下的聚类情况除 PAUP 中构建的 ML 树外,其他分

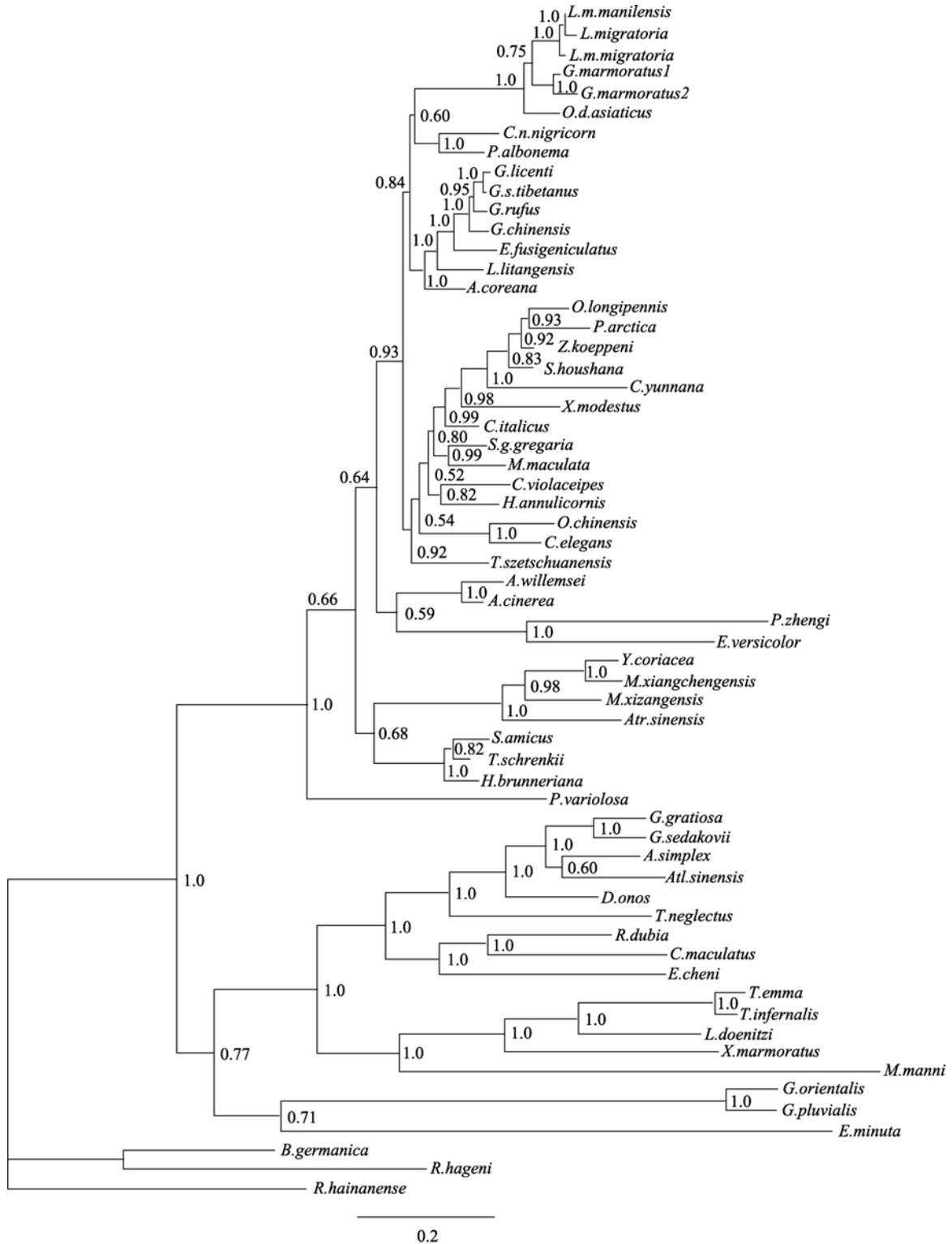


图 1 基于 16S rRNA 数据集的 BI 树

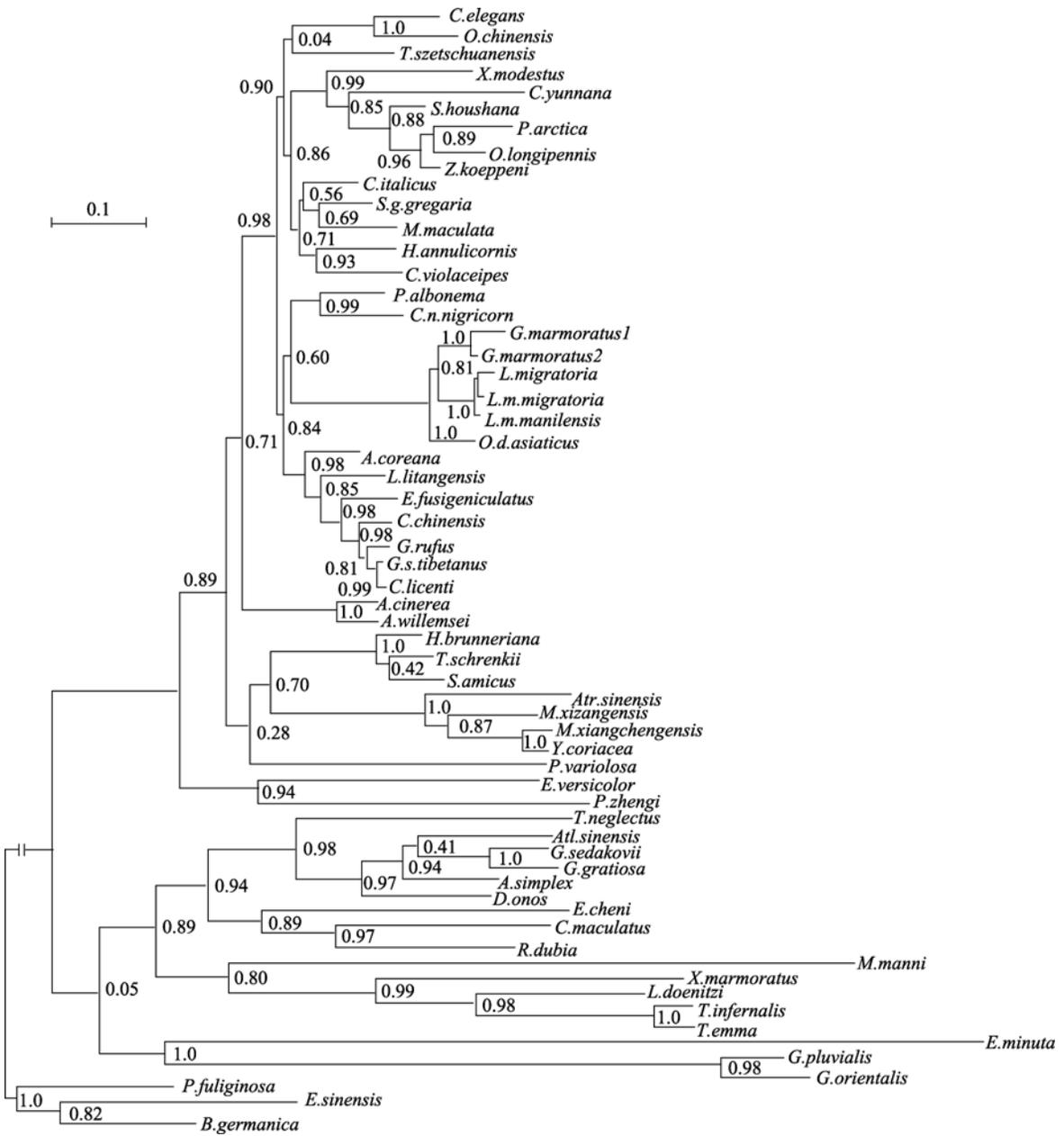


图 2 基于 16S rRNA 数据集的构建 ML 树

支聚类极为相似：先是归于蝗亚目下的蚤蝼总科与螞亚目下的蝼蛄总科聚在一起，螞总科与驼螞总科聚类后与蟋蟀总科形成姐妹群，再和蚤蝼总科与蝼蛄总科形成的分支互为姐妹群。蟋蟀总科为单系群，螞总科与驼螞总科的类群相互交织，不存在单系性。

在 RAxML 和 PhyML 构建的 ML 树中，除了传统的蝗总科类群的聚类情况有较小的变动外，其他物种的聚类情况完全相同。大腹蝗科在蝗亚目分支

的基部，然后再分化出螞总科和蝗总科两个平行的分支。蝗总科下分成两大分支，即一支为瘤锥蝗科和锥头蝗科与癞蝗科形成的姐妹群；另一支为剑角蝗科、斑腿蝗科、斑翅蝗科、网翅蝗科和槌角蝗科 5 个类群，其中除斑腿蝗科和槌角蝗科是单系群外，其余 3 科都不是单系群。

在 PAUP 中构建的 ML 树中也将直翅目分成两大分支，两大分支各自包括的类群与 RAxML 和 PhyML 中的结果相同，但是在分支顺序上发生了变

化。这些变化主要是在螞总科、大腹蝗科、蚤蝼总科以及蝼蛄总科的位置变化。直翅目下先是分出螞总科与蝗总科,蝗总科下大腹蝗科与癞蝗科聚在一起, *Xyleus modestus* 在瘤锥蝗科和锥头蝗科与癞蝗科形成的分支中最早分出。蝗总科剩余类群的聚类情况与其他 ML 树类似。蚤亚目下蝼蛄总科在分支的基部,而后是蚤蝼总科与蚤亚目剩余类

群形成的平行分支,且蚤亚目剩余类群的分支也与其他方法构建的系统发生树的分支情况完全相同。

在 PAUP 中构建的加权 MP 树也将其分成两大类群,蚤亚目下的聚类与其他系统树相同。蝗亚目也是分出螞总科与蝗总科,但与其他树不同的是大腹蝗科在蝗总科分支的基部。Bayes 树的分支情况与其他的系统树的分支也类似,其最大差别的是螞总科与蝗总科下剑角蝗科的两个种聚在一起。

在构建的所有系统树种,目、亚目阶元和属种级阶元的分支支持度普遍大于 70%,有极个别在 50%~70%之间,而在总科级和科级阶元的支持度大部分要小于 50%。

#### 2.4 16S rRNA 数据的系统发生功效和茎环区系统发生信号强度分析

以 ClustalX2 比对后的结果构建 MP 树,采用

PBS 值(Partitioned Bremer support indices)对茎、环区的系统发生信号进行的评估和比较发现(表 3),茎区和环区各自所含有的系统发生信号有较大的差别,环区的系统发生信号要比茎区的强。环区的 PBS 值最大为 94,最小值为-1.5,平均值为 14.75;茎区的 PBS 值最大为 69,最小值为-8.5,平均值为 9.72。在 57 个节点中,有 36 个节点的环区 PBS 值要大于茎区,占总结点数的 63.16%,有相同 PBS 值的茎环区的节点 12 个,占总结点数的 21.05%,而 PBS 值茎区大于环区的节点数仅占了 15.79%;在得到的所有茎环区 PBS 值中出现了 5 个负值,而且负值在茎区占 80%,分别是在蚤蝼总科和蝼蛄总科节点、螞总科与蝗总科的节点以及蝼蛄总科下蝼蛄科与蝼蛄科的节点上茎区的 PBS 为负值。因此可以说在对直翅目昆虫的系统发生关系进行重建时,16S rRNA 基因环区的贡献要比茎区的贡献大。

### 3 讨论

#### 3.1 蝗亚目下部分类群的分类地位

国外直翅目分类系统中普遍认同的是Otte<sup>[32]</sup>系统,在该系统中将蝗亚目分为 8 个总科,将蚤亚目分为 6 个总科。除了从蝗总科中划分出锥头蝗总科、

表 3 直翅目线粒体 16S rRNA 基因茎环区 PBS 分析结果

节点	环区	茎区	节点	环区	茎区	节点	环区	茎区
1	31.68	17.23	20	3	5	39	9.5	1.5
2	4.5	8.5	21	0	0	40	3	2.5
3	20.38	-4.38	22	20.5	8.5	41	14	8
4	94	69	23	20.5	8.5	42	3	3
5	15	8.75	24	38	27.0	43	10.7	7.2
6	12	18	25	0	0	44	0	0
7	22	-8.5	26	35.83	34.94	45	0	0
8	28.5	16.94	27	0.5	0.5	46	0	0
9	66.69	37.64	28	29.5	20.5	47	14.83	4.5
10	22.21	12.54	29	22.5	25.5	48	0	0
11	10	15	30	1.5	1.5	49	11.5	6.5
12	10	13	31	0	0	50	8.17	8.83
13	4.5	15.5	32	0	0	51	12	6
14	21	19	33	14.93	12.79	52	11.5	7.5
15	2.5	10.5	34	45.25	36.5	53	7.5	2.5
16	0	0	35	-1.5	-2.5	54	13	10.25
17	17	11	36	7	3.75	55	13	8
18	20.33	-4.17	37	26.5	12.5	56	10.67	6
19	17.5	0.5	38	9.63	7	57	5	5

大腹蝗总科和 Tanaoceroidea, 以及将蟋蟀总科与螳螂总科合并为蟋蟀总科外, 其余各总科与我国的分类系统基本相同。

中国蝗总科分类中广泛采用的是 9 科分类系统, 其中 8 科在我国有分布<sup>[33]</sup>。Otte 分类系统将我国蝗总科中的剑角蝗科、斑腿蝗科的多数亚科、斑翅蝗科、网翅蝗科、槌角蝗科 5 科合并归入蝗科。以本研究涉及的直翅目昆虫构建的 ML 和 BI 系统树显示, 蝗总科昆虫分成 2 个分支: 锥头蝗科、瘤锥蝗科和癩蝗科组成一个分支; 斑腿蝗科、斑翅蝗科、剑角蝗科、槌角蝗科和网翅蝗科形成另一个分支, 考虑到这 5 个科的遗传距离相近而且差异不大, 在重建的系统发生树种的位置相对稳定不变, 因此建议将这 5 个科合并为一个科, 即归为蝗科, 而且这一结论也得到很多研究的支持<sup>[34-36]</sup>。

在夏氏系统中, 剑角蝗科一直被看作是单系群, 包含 6 个亚科。但本研究中所建的系统发生关系树表明, 剑角蝗科不存在单系性, 其中云南卡蝗与斑退蝗科聚在一起。尽管这与夏氏分类系统不符, 但是分支节点间的自举检验值(95)和后验概率(1.0)都较高, 而且 Otte 系统上也将其归为斑退蝗科。另外, Sun 等<sup>[15]</sup>用 16S rRNA 对中国剑角蝗科的单系性及其 6 属的系统发育关系进行了探讨, 结果显示所建分子系统树中的系统发生关系与中国的分类系统差别较大, 都不支持剑角蝗科是单系群, 因此以触角形状作为分类参照的可靠性还有待于进一步考察验证。本研究支持夏氏系统中的斑翅蝗科单系性, 这与 Liu 等<sup>[35]</sup>利用 12/16 S rRNA 对蝗科高级阶元进行了系统发生分子分析的结论一致。

另外, 在夏氏系统中, 根据触角等外部形态将锥头蝗科和瘤锥蝗科被分为两个不同的科, 而刘举鹏<sup>[37]</sup>依据对蝗卵的研究提出把瘤锥蝗科合在锥头蝗科; 许升全等<sup>[38]</sup>选择了 22 个性状作为支序系统学分析的依据, 研究表明将锥头蝗科和瘤锥蝗科合并为一个科较为妥当。根据本研究的结果, 锥头蝗科和瘤锥蝗科的遗传距离差异不大, 且锥头蝗科比瘤锥蝗科相对原始, 建议应该把锥头蝗科和瘤锥蝗科合为一个科, 这样更有利于国内外学者的交流。

螞总科的系统发生地位不稳定, 在 BI 树中, 螞总科与剑角蝗科聚在一起。这与大部分支持螞总科单系性的研究不符, 这很有可能是由重建系统树的

方法不同而引起, 或是由取样数量较少造成。

### 3.2 蠹亚目下部分类群的分类地位

一直以来对于蝗亚目昆虫的研究要多于蠹亚目, 蠹亚目成员的分子数据也相对较少。本研究涉及的蠹亚目昆虫只包括 4 总科的成员, 取样密度也没有蝗亚目的大。但是在所涉及到的这 4 个总科中, 除了螳螂总科的位置不确定外, 其他 3 总科的聚类情况和相对位置都很稳定。在重建的系统发生树中, 蠹亚目分成两支, 即一支为螞斯总科和驼螞总科相聚后与蟋蟀总科形成的姐妹群; 另一支是螳螂总科与蚤螳总科在大部分树中互为姐妹群。螞斯总科下硕螞科与螞斯科的进化关系比较近, 而且螞斯总科与驼螞总科的成员相互交织, 没有得到较好的解析。

本研究中蠹亚目的蟋蟀科并不与螳螂科互为姐妹群, 而与螞斯总科的类群聚为一支, 而且从遗传距离来看, 蟋蟀总科和螳螂总科与直翅目其他类群的遗传距离偏大。因此本研究支持将螳螂科作为螳螂总科的划分方式。螳螂总科与蚤螳总科为姐妹群, 但蚤螳总科与直翅目其他类群的遗传距离偏大, 分支支持度也不高, 这有可能是由于该类群取样单一, 或由于生活方式改变所受到的选择压力的不同, 最终引起基因序列之间存在较大差异所致, 也不排除长枝吸引问题的存在。因此它们两者在直翅目的定位还有待进一步研究。

### 3.3 不同比对方法和建树方法结果的比较

对采用两种软件 MAFFT 和 ClustalX2 的比对结果所重建的系统发生树比较分析发现, 在重建的系统发生树中, 除了蚤螳总科、螳螂总科、螞总科以及蝗总科的大腹蝗科的位置有差别之外, 其他物种都能稳定的进行聚类, 而且它们都有几个共同点, 即: (1)直翅目昆虫可以与外群以较高的置信度完全分开; (2)直翅目下各类群之间在 10 棵基因树中的聚类情况极为相似, 但都有共同的差异, 这种差异主要是蚤螳总科和螳螂总科的位置变换不定; (3)蟋蟀总科, 螞斯总科, 驼螞总科, 螞总科, 蝗总科下斑腿蝗科的所有物种, 瘤锥蝗科与锥头蝗科以及癩蝗科聚类形成的分支非常稳定, 而且它们的拓扑结构在各系统发育树中基本一致; (4)蝗总科包括两个大的分支, 即瘤锥蝗科、锥头蝗科和癩蝗科相聚后与大腹蝗科形成的姐妹群, 另一支是剑角蝗科、斑腿蝗

科、斑翅蝗科、网翅蝗科和槌角蝗科共同构成的单系群; (5)在蝗总科低级阶元上,云南卡蝗与斑退蝗科聚在一起,剑角蝗科的白纹佛蝗和网翅蝗科的青脊竹蝗单独聚成的一小支与斑腿蝗科互为姐妹群,而且这种聚类分支也非常稳定。(6)除了 BI 树之外,在高级阶元和属种阶元上的分支支持度较高,而在总科和科级水平上支持度都很低;(7)MAFFT 比对生成的文件重建的系统发生树的聚类情况来看,蝗亚目下的物种聚类情况和 ClustalX2 比对后生成的文件所建的树聚类情况完全一致,但是蚤亚目下的物种间的关系没有得到很好的解析。

#### 3.4 线粒体 16S rRNA 基因序列作为分子标记用于直翅目昆虫不同分类阶元上的及功效与性能

目前可用于系统发育分析的mtDNA基因主要有 12S rRNA、16S rRNA、*COI*、*COII*、*ND1*、*ND2* 和 *ND5* 等,其中以 16S rRNA、*COI*以及核基因 18S rDNA作为DNA条形码对物种系统发生关系的研究尤为普遍。Caterino等<sup>[39]</sup>建议将常用的线粒体基因 *COI*、16S rDNA和核基因 18S rDNA、*EF-1 $\alpha$*  这 4 个标记作为昆虫系统发育的标准标记。在利用DNA条形码做分子标记的同时,学者们对于DNA条形码在物种分类方面的可行性也在不断地进行着验证。

16S rRNA基因作为DNA条形码标记有它的优势。16S rRNA存在于直翅目的所有类群中,有其通用引物,上游引物为:16Sar5'(5'-TAAATGATCC-TTCCGCAGGTTCA-3'),下游引物为:16Sbr-3'(5'-TTC TGGTTGATCCTGCCAG-3')<sup>[40]</sup>。可以方便的从样本中分离出来并且进行PCR扩增;在不同区段具有不同的进化速率、结构保守、含量丰富、序列长度适中、序列更加接近于祖先基因组序列以及具有潜在的通用性等特点,因此被国内外学者作为分子标记,广泛用于动物不同分类阶元的系统发生学研究。这些研究结果显示 16S rRNA在不同分类阶元都具有较强的解析能力。另外,Vences等<sup>[41]</sup>研究了两栖类的 16S rRNA,认为其作为两栖类的DNA条形码要优于 *COI*基因,在分析亲缘关系比较远的类群时极为有效,而且强烈建议将 16S rRNA作为动物标准DNA条形码标记*COI*的补充。结合本研究以及Flook等<sup>[8]</sup>、Sperling等<sup>[42]</sup>得出的结论,认为 16S rRNA适于研究的分类阶元跨度较大,可以将其作为DNA条形码标

记用于直翅目昆虫不同分类阶元间的系统发生关系研究。

另外,对 58 个直翅目物种的 16S rRNA 基因序列进行比对、碱基替换饱和性分析、遗传距离计算、*gi* 检验以及利用不同的建树方法等各方面综合分析发现,16S rRNA 在直翅目昆虫不同分类阶元上具有较强的系统发育信号,分支支持度相对较高,而且用不同的方法所构建的基因树差异很小,与物种树之间的一致性极高,尤其在目级、亚目级和属种级阶元上的有较好的解析度。这很有可能就是因为 16S rRNA 基因在结构上既有保守区,又有变异区而造成的,保守区中存在的内环、发卡环以及内环与发卡环等茎环结构的微妙变化可以很好地区分属种阶元的不同,而高度变异区能更好地对亲缘关系较远的物种进行稳定的区分和辨别。对茎、环区的 PBS 值进行比较分析发现,环区对于重建系统发生数的贡献要比茎区的大,这很有可能是因为环区的变异程度相对比茎区要大,导致其包含的信息量也要比茎区的多,同时也说明在亲缘关系较近的物种中,变异位点的多少才是决定其信息含量的多少。

虽然 16S rRNA 基因能够将直翅目大部分类群进行定位,但由于本研究所选取的物种分布不均,数量有限,且仅凭单个基因对直翅目所有昆虫进行准确定位还是有其不足之处。要更加系统地对直翅目昆虫的分类进行研究,还需要借助于其他的分子标记或与其他基因联合进行分析,才能更加有效地解决直翅目中存在争议的类群。

#### 参考文献(References):

- [1] 谭娟杰. 昆虫的地质历史. 动物分类学报, 1980, 5(1): 1-12. DOI
- [2] Gorochov AV, Rasnitsyn AP. Superorder Gryllidea Laidcharting, 1781 (=Orthopteroidea Handlirsch, 1903). In: Rasnitsyn AP, Quicke DLJ, eds. History of Insects. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2002: 293-303. DOI
- [3] 郑乐怡, 归鸿. 昆虫分类. 南京: 南京师范大学出版社, 1999: 272-276. DOI
- [4] Han HY, Ro KE. Molecular phylogeny of the family Tephritidae (Insecta: Diptera): new insight from combined analysis of the mitochondrial 12S, 16S, and *COII* genes. *Mol Cells*, 2009, 27(1): 55-66. DOI
- [5] Roháček J, Tóthová A, Vaňhara J. Phylogeny and affilia-

- tion of European Anthomyzidae (Diptera) based on mitochondrial 12S and 16S rRNA. *Zootaxa*, 2009, 2054(1): 49–58. [DOI](#)
- [6] Gillespie JJ, Johnston JS, Cannone JJ, Gutell RR. Characteristics of the nuclear (18S, 5.8S, 28S and 5S) and mitochondrial (12S and 16S) rRNA genes of *Apis mellifera* (Insecta: Hymenoptera): structure, organization, and retrotransposable elements. *Insect Mol Biol*, 2006, 15(5): 657–686. [DOI](#)
- [7] Yoshizawa K, Johnson KP. Phylogenetic position of Phthiraptera (Insecta: Paraneoptera) and elevated rate of evolution in mitochondrial 12S and 16S rDNA. *Mol Phylogenet Evol*, 2003, 29(1): 102–114. [DOI](#)
- [8] Flook PK, Rowell CHF. The effectiveness of mitochondrial rRNA gene sequences for the reconstruction of the phylogeny of an insect order (Orthoptera). *Mol Phylogenet Evol*, 1997, 8(2): 177–192. [DOI](#)
- [9] Nagaraja, Nagaraju J, Ranganath HA. Molecular phylogeny of the *nasuta* subgroup of *Drosophila* based on 12S rRNA, 16S rRNA and *COI* mitochondrial genes, RAPD and ISSR polymorphisms. *Genes Genet Syst*, 2004, 79(5): 293–299. [DOI](#)
- [10] 印红, 张道川, 毕智丽, 印展, 刘勇, 印象初. 蝗总科部分种类 16S rRNA 的分子系统发育关系. *遗传学报*, 2003, 30(8): 766–772. [DOI](#)
- [11] Buckley TR, Simon C, Flook PK, Misof B. Secondary structure and conserved motifs of the frequently sequenced domains IV and V of the insect mitochondrial large subunit rRNA gene. *Insect Mol Biol*, 2000, 9(6): 565–580. [DOI](#)
- [12] Smith SD, Bond JE. An analysis of the secondary structure of the mitochondrial large subunit rRNA gene (16S) in spiders and its implications for phylogenetic reconstruction. *J Arachnol*, 2003, 31(1): 44–54. [DOI](#)
- [13] Chen AH, Jiang GF. Phylogenetic relationships among 12 species of Tetrigidae (Orthoptera: Tetrigoidea) based on partial sequences of 12S and 16S ribosomal RNA. *Zool Res*, 2004, 25(6): 510–514. [DOI](#)
- [14] Lu HM, Huang Y. Phylogenetic relationship of 16 Oedipodidae species (Insecta: Orthoptera) based on the 16S rRNA gene sequences. *Insect Sci*, 2006, 13(2): 103–108. [DOI](#)
- [15] Sun ZL, Jiang GF, Huo GM, Liu DF. A phylogenetic analysis of six genera of Acrididae and monophyly of Acrididae in China using 16S rDNA sequences (Orthoptera, Acridoidea). *Acta Zool Sin*, 2006, 52(2): 302–308. [DOI](#)
- [16] Legendre F, Robillard T, Song HJ, Whiting MF, Desutter-Grandcolas L. One hundred years of instability in ensiferan relationships. *Syst Entomol*, 2010, 35(3): 475–488. [DOI](#)
- [17] Bonfield JK, Smith KF, Staden R. A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23(24): 4992–4999. [DOI](#)
- [18] Burland TG. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. *Methods Mol Biol*, 2000, 132(1): 71–91. [DOI](#)
- [19] Katoh K, Toh H. Improved accuracy of multiple ncRNA alignment by incorporating structural information into a MAFFT-based framework. *BMC Bioinformatics*, 2008, 9(1): 212. [DOI](#)
- [20] Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 2007, 23(21): 2947–2948. [DOI](#)
- [21] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(10): 2731–2739. [DOI](#)
- [22] Zhou ZJ, Huang Y, Shi FM. The mitochondrial genome of *Ruspolia dubia* (Orthoptera: Conocephalidae): a short A+T-rich region with 70 bp in length. *Genome*, 2007, 50(9): 855–866. [DOI](#)
- [23] 丁方美, 师红雯, 黄原. 短额负蝗线粒体基因组及其 1rRNA 和 srRNA 二级结构分析. *动物学研究*, 2007, 28(6): 580–588. [DOI](#)
- [24] Nylander JAA. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Uppsala University: Evolutionary Biology Centre, 2004. [DOI](#)
- [25] Niu P. MrMTgui: cross-platform interface for Model Test and MrModeltest. 2008. <<http://www.genedrift.org/mtgui.php>>
- [26] Guindon S, Gascuel O. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol*, 2003, 52(5): 696–704. [DOI](#)
- [27] Stamatakis A. RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 2006, 22(21): 2688–2690. [DOI](#)
- [28] Swofford DL. PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods), version 4.0b10 (Alvitec). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2002.
- [29] Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 2003, 19(12): 1572–1574. [DOI](#)
- [30] Jobb G. TREEFINDER Version of November 2007. Mu-

- nich, Germany, 2007. <<http://www.treefinder.de>>
- [31] Sorenson MD, Franzosa EA. TreeRot, version 3. Boston University, Boston, MA, 2007. <<http://people.bu.edu/msoren/TreeRot.html>>
- [32] Otte D. Orthoptera Species File. Philadelphia: The Academy of Natural Sciences, 1997.
- [33] 夏凯龄. 中国蝗科分类概要. 北京: 科学出版社, 1958: 1-239. [DOI](#)
- [34] 芦荣胜, 黄原, 周志军. 基于线粒体 *Cytb*、16S rDNA 和核 28S rDNA 的中国斑腿蝗科(直翅目, 蝗总科)九亚科间的系统发育关系研究. 动物分类学报, 2010, 35(4): 782-789. [DOI](#)
- [35] Liu DF, Dong ZM, Zhang DY, Gu YZ, Guo PJ, Han RH, Jiang GF. Molecular phylogeny of the higher category of Acrididae (Orthoptera: Acridoidea). *Zool Res*, 2008, 29(6): 585-591. [DOI](#)
- [36] 汪晓阳, 周志军, 黄原, 石福明. 基于 18S rRNA 基因序列的直翅目主要类群系统发育关系研究. 动物分类学报, 2010, 36(3): 627-638. [DOI](#)
- [37] 刘举鹏. 蝗卵形态结构与蝗虫系统发育关系的初步研究. 见: 系统进化动物学论文集, 第 1 集. 北京: 中国科技出版社, 1991: 89-94. [DOI](#)
- [38] 许升全, 李后魂, 郑哲民. 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, 2003, 28(3): 381-384. [DOI](#)
- [39] Caterino MS, Cho S, Sperling FAH. The current state of insect molecular systematics: A thriving Tower of Babel. *Annu Rev Entomol*, 2000, 45(1): 1-54. [DOI](#)
- [40] Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann Entomol Soc Am*, 1994, 87(6): 651-701. [DOI](#)
- [41] Vences M, Thomas M, van der Meijden A, Chiari Y, Vieites DR. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Front Zool*, 2005, 2(1): 5. [DOI](#)
- [42] Sperling F. DNA Barcoding: deus ex machina. Newsletter of the Biological Survey of Canada (Terrestrial Arthropods). 2003, 22(2): 50-53. [DOI](#)

## • 综合信息 •

### 《基因组学：核心实验方法》

新生物学丛书

于军 译 出版时间：2012 年 3 月 书号：978-7-03-033378-0

装帧：平装 开本：16 开 定价：¥75.00

近些年基因组学研究取得了重大进展。在本书中，国际著名科学家组成的团队与读者一同分享在基因组学领域的最新信息。这几年基因组学研究逐渐把重点从基因识别转移到功能基因组学和对基因及其产物描述等方面。本书以广阔的视角向读者解读这个复杂的主题，通过集中讨论如数据分析等系列关键问题，并对基因组学与之相关的领域做出重要的概述。无论是现在还是将来，本书都是一本全面的研究指南，它既描述了关键性的新技术也讲解了传统的经典方法。每一章都对不同方法的优点和局限性做出讨论，同时给出可信的实验流程以及大量实际可行的建议，以供读者直接使用。

由于基因组学的影响力日益扩大，新技术不断产生，海量数据迅速积累，基因组学的核心实验方法已经被应用到生命科学研究的各个领域当中。因此，本书非常适合于从事基因组学及其在生命科学领域的各个衍生学科研究的研究生和青年学者阅读。他们不仅可以在这里了解到实验技术的详细步骤，还可以掌握实验技术的根本思想和原理，有助于进一步提出其他的替代方法。

于军

科学出版社 科学销售中心 联系人：周文宇 电话：010-64022646 010-64017321

<http://shop.sciencepress.cn/>; E-mail:zhouwenyu@mail.sciencep.com