

利用 16S rDNA 基因序列进行害竹飞虱 (半翅目:飞虱科)的分子鉴定

侯晓晖^{1,2}, 陈祥盛^{1*}

(1. 贵州大学昆虫研究所/贵州山地农业病虫害重点实验室, 贵州 贵阳 550025; 2. 遵义医学院, 贵州 遵义 563003)

摘要:采用 DNA 测序技术测定了中国飞虱科 5 属 10 种 15 个地理种群的线粒体 16S rDNA 基因长约 480 bp 片段的序列, 分析了其序列组成及变异特征。所获序列中, A + T 约占 77.5%, 其中, 190 个核苷酸位点发生了变异(约占 39.6%)。利用 MEGA 4.0 软件计算遗传距离, 外群与内群的遗传距离平均值(0.317)最高, 内群各属间和各属内遗传距离平均值(分别为 0.209 和 0.132)次之, 而种内不同地理种群间的遗传距离平均值(0.013)最低。构建了 10 种飞虱科昆虫的 MP 和 NJ 分子系统树, 结果显示: 各属飞虱基本上形成单系群; 各种飞虱各自不同地理种群均聚为一支, 构成一单系群, 可以很好的区分不同种类的飞虱。上述结果与形态学研究结果非常吻合。

关键词: 飞虱科; 害竹飞虱; 16S rDNA; 分子鉴定; 小头飞虱属; 梯顶飞虱属

中图分类号: S763

文献标识码: A

Molecular Identification of Bamboo Planthoppers (Hemiptera: Delphacidae) Based on Mitochondrial 16S rDNA Gene Sequences

HOU Xiao-hui^{1,2}, CHEN Xiang-sheng¹

(1. Institute of Insects, Guizhou University / Guizhou Key Laboratory for Plant Pest Management of Mountainous Region, Guiyang 550025, Guizhou, China; 2. Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou, China)

Abstract: Approximately 480 base pairs of mitochondrial 16S rDNA gene were sequenced for 15 species of Delphacidae. Of 480 bp mitochondrial 16S rDNA gene sequences, the percentage of A + T was about 77.5%, and 190 nucleotide sites were substituted (about 39.6%). The genetic distance of outgroup and ingroup, intergenus, interspecies and intraspecies were 0.317, 0.209, 0.132 and 0.013 respectively. The molecular phylogenetic trees constructed by parsimony method and neighbor-joining method suggest that the ingroup and outgroup are independent evolutionary branches. The genus and species formed monophyletic groups respectively, so accuracy identification is possible through the research of sequences. These results are identical with that of morphology.

Key words: Delphacidae; bamboo planthoppers; 16S rDNA; molecular identification; *Malaxella*; *Arcofacies*

飞虱科昆虫是半翅目(Hemiptera)头喙亚目(Auchenorrhyncha)蜡蝉总科(Fulgoroidea)中最大的一个科, 该科昆虫均为植食性, 以刺吸式口器吮吸植物的汁液、夺取植物的营养, 使植物营养不良, 或至枯萎, 或在吮吸部位出现黄色或黄褐色病斑, 有的种

类还能传播植物病毒病^[1]。飞虱科中的很多种类是重要的农林害虫, 全世界专门取食为害竹子的飞虱共有 20 属 105 种, 其中, 多数为凹距飞虱族(Tropidocephalini)的种类, 每年都对林业生产造成巨大损失^[1-3]。竹子飞虱发生数量大, 繁殖速度惊人, 已成

收稿日期: 2012-04-17

基金项目: 国家自然科学基金(31160163); 贵州省国际科技合作项目(黔科合外 G 字(2010)7005)

作者简介: 侯晓晖(1980—), 女, 副教授, 主要从事飞虱科昆虫分子系统学研究。E-mail: hxh19801122@163.com.

* 通讯作者。

为竹子上较重要的一类害虫,如叉突竹飞虱(*Bambusiphaga furca* Huang et Ding)、橘色竹飞虱(*B. citricolorata* Huang et Tian)、台湾竹飞虱(*B. taiwanensis* (Muir))、花翅梯顶飞虱(*Arcofacies maculatipennis* Ding)、黄小头飞虱(*Malaxella flava* Ding et Hu)、台湾叶角飞虱(*Purohita twiwanensis* Muir)、中华叶角飞虱(*P. sinica* Huang et Ding)、短头飞虱(*Epeurysa nawai* Matsumura)等^[4-8]。

害竹飞虱种类繁多,近缘类群不易区分,如簇角飞虱属(*Belocera* Muir)的中华簇角飞虱(*B. sinensis* Muir)、褐额簇角飞虱(*B. fuscifrons* Chen)和爬竹簇角飞虱(*B. ampelocalamus* Chen et Tsai);小头飞虱属的黄小头飞虱和四刺小头飞虱(*M. tetracantha* Qin et Zhang)^[1,5,9-10];此外,同一种类的不同地理种群外形差异也较大,如爬竹梯顶飞虱(*A. ampelocalamus* Chen)、黄小头飞虱^[6,11],这些都给实际鉴定工作带来困难。为了更好的对上述近缘类群及不同

地理种群等进行研究,本文利用相关种类的16S rDNA 基因序列进行序列比对、遗传距离分析和系统发育重建等工作,以凹距飞虱族中的害竹飞虱为内群、飞虱族中褐飞虱属(*Nilaparvata* (Stål))为外群^[12-13],探讨相关种类的分子系统关系。弄清害竹飞虱的分类关系,对于探讨飞虱科、凹距飞虱族分类关系及系统演化具有重要意义,同时也可在实际生产中害虫的鉴定提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

供试标本5属10种15地理种群为近年作者采自海南、广东等地的飞虱科、飞虱亚科、凹距飞虱族和飞虱族的代表种类,标本均保存于无水乙醇中^[12],相关信息见表1。实验前将供试飞虱标本外生殖器解剖并保存于甘油中备查。

表1 本研究中所用的标本

属	种名	采样地点	序列号
簇角飞虱属	中华簇角飞虱(<i>B. sinensis</i> Muir)	广东广州华南植物园	HM233759
	中华簇角飞虱(<i>B. sinensis</i> Muir)	海南尖峰岭	HM233801
	褐额簇角飞虱(<i>B. fuscifrons</i> Chen)	贵州贵阳花溪	HM233758
	爬竹簇角飞虱(<i>B. ampelocalamus</i> Chen et Tsai)	贵州兴义马岭河	HM233760
梯顶飞虱属	梯顶飞虱(<i>A. fullaway</i> Muir)	广东珠海三灶	HM233739
	梯顶飞虱(<i>A. fullaway</i> Muir)	海南大田	HM233796
	爬竹梯顶飞虱(<i>A. ampelocalamus</i> Chen)	贵州兴义马岭河	HM233773
	爬竹梯顶飞虱(<i>A. ampelocalamus</i> Chen)	贵州道真大沙河	HM233775
叶角飞虱属	纹翅叶角飞虱(<i>P. theognis</i> Fennah)	广东珠海三灶	HM233737
	台湾叶角飞虱(<i>P. taiwanensis</i> Muir)	广东肇庆七星岩	HM233734
	台湾叶角飞虱(<i>P. taiwanensis</i> Muir)	广东广州华南植物园	HM233782
小头飞虱属	黄小头飞虱(<i>M. flava</i> Ding et Hu)	广东珠海三灶	HM233744
	黄小头飞虱(<i>M. flava</i> Ding et Hu)	海南五指山	HM233772
	四刺小头飞虱(<i>M. tetracantha</i> Qin et Zhang)	海南大田	HM233795
褐飞虱属	褐飞虱(<i>N. lugens</i> (Stål))	广东珠海三灶	HM233749

1.2 实验方法

1.2.1 基因组DNA的提取 将保存于无水乙醇中的标本用无菌双蒸水浸泡3d以上,实验前用STE溶液浸泡标本过夜^[14],后将供试虫体水分吸干并将其研磨至无明显组织块,用基因组DNA抽提试剂盒提取基因组DNA,溶解在TE中,测定浓度后调整为 $1\sim 2\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 PCR扩增及产物回收 PCR扩增引物参考文献^[12],引物序列为:16S-PF(5'-GCCTGTTTATCAAAAACAT-3'),16S-PR(5'-CCGGTCTGAACTCAGATCA-3'),由上海生工生物技术公司合成。每

一样品的PCR反应总体积为 $25\ \mu\text{L}$,内含 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris(pH值8.3), $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, 0.01% Triton X-100, $2.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , $0.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP, $0.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物, 1.0 U Taq酶以及 $1\ \mu\text{L}$ (含 $1\sim 2\text{ ng}$ DNA)模板溶液。PCR反应条件为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性7min,之后每个循环包括 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性50s, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火1min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸1min,35个循环, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸10min。PCR产物用1.0%的琼脂糖凝胶电泳进行检测其片段大小、纯度及含量。

1.2.3 PCR产物的回收及克隆 通过琼脂糖凝胶电

泳检测后,对扩增效果良好且足量的 PCR 产物采用 UNIQ-10 柱式胶回收试剂盒进行回收纯化, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用或继续实验。PCR 回收产物与 PMD18-T 载体连接, $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存 3 h 以上,再用热激法转化进 DH5 α 感受态细菌中,蓝白斑筛选出阳性克隆后扩增备用。

1.2.4 阳性克隆质粒提取及测序 阳性克隆菌质粒由北京天根公司的质粒小提试剂盒提取,测序由大连宝生物工程有限公司完成。测序仪为 ABI PRISM TM 3730XL DNA Analyzer,反应试剂为 Big-Dye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems),测序引物为通用引物。

1.3 数据分析

本研究测定了飞虱科 5 属 10 种 15 地理种群的 16S rDNA 序列(表 1),用 Clustal X 2.0 对其序列进行比对,其参数设置为默认参数^[15]。通过分析软件 MEGA 4.0^[16] 分析各物种间 16S rDNA 基因的碱基组成、变异位点、简约信息位点和遗传距离等。系统发育分析以褐飞虱为外群^[12-13],利用 MEGA 4.0 软件中邻接法(Neighbor-joining method, NJ)和最大简约法(Maximum parsimony, MP)重建分子系统树,并通过 Bootstrap 1 000 次自举检验系统树中各结点的置信值。

2 结果与分析

2.1 碱基组成及序列变异

利用 MEGA 4.0 软件对本研究中相关种类的

mtDNA 16S rDNA 序列进行统计分析,结果表明:共有 480 个位点(包括 Gap),其中, A、T、G、C 含量分别为 37.1%、40.4%、14.4%、8.1%, A + T 的平均含量为 77.5%, G + C 的平均含量为 22.5%;共检测到变异位点 190 个,其中,简约信息位点 157 个,自裔位点 32 个,约占总序列的 39.6%。本研究所获序列已登录 GenBank,序列号见表 1。

2.2 遗传距离分析

利用 MEGA 4.0 软件统计飞虱科 5 属 10 种 15 地理种群的 16S rDNA 序列间遗传距离,结果(表 2)表明:外群和内群(即褐飞虱属与梯顶飞虱属、簇角飞虱属、叶角飞虱属、小头飞虱属)间的遗传距离为 0.283(褐飞虱与爬竹梯顶飞虱 DZ)到 0.363(褐飞虱与中华簇角飞虱 HN);内群各属(即梯顶飞虱属、簇角飞虱属、叶角飞虱属和小头飞虱属)间的遗传距离为 0.162(纹翅叶角飞虱与爬竹梯顶飞虱 DZ)到 0.264(台湾叶角飞虱 ZQ 与黄小头飞虱 HN);在内群各属不同种间,遗传距离为 0.075(爬竹簇角飞虱与褐额簇角飞虱)到 0.196(梯顶飞虱 HN 与爬竹梯顶飞虱 DZ);在内群各属同种不同地理种群间,遗传距离为 0.002(梯顶飞虱 GD 和 HN、中华簇角飞虱 GD 和 HN、台湾叶角飞虱 ZQ 和 GZ)到 0.035(爬竹梯顶飞虱 XY 和 DZ)。

表 2 10 种飞虱 16S rDNA 基因序列的遗传距离

飞虱种类	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 褐额簇角飞虱														
2 中华簇角飞虱(GD)	0.121													
3 中华簇角飞虱(HN)	0.124	0.002												
4 爬竹簇角飞虱	0.075	0.124	0.122											
5 梯顶飞虱(GD)	0.213	0.217	0.220	0.194										
6 梯顶飞虱(HN)	0.216	0.220	0.217	0.191	0.002									
7 爬竹梯顶飞虱(XY)	0.171	0.207	0.210	0.200	0.188	0.191								
8 爬竹梯顶飞虱(DZ)	0.169	0.198	0.201	0.203	0.193	0.196	0.035							
9 纹翅叶角飞虱	0.166	0.182	0.185	0.169	0.222	0.225	0.168	0.162						
10 台湾叶角飞虱(ZQ)	0.206	0.210	0.213	0.205	0.219	0.222	0.189	0.180	0.110					
11 台湾叶角飞虱(GZ)	0.201	0.206	0.209	0.201	0.214	0.217	0.185	0.176	0.107	0.002				
12 黄小头飞虱(GD)	0.177	0.240	0.243	0.188	0.246	0.250	0.179	0.177	0.214	0.249	0.244			
13 黄小头飞虱(HN)	0.190	0.249	0.252	0.197	0.250	0.253	0.179	0.188	0.226	0.264	0.259	0.022		
14 四刺小头飞虱	0.186	0.234	0.237	0.198	0.238	0.241	0.176	0.180	0.209	0.235	0.230	0.077	0.082	
15 褐飞虱	0.325	0.360	0.363	0.352	0.300	0.303	0.288	0.283	0.318	0.318	0.312	0.312	0.314	0.285

从本文的遗传距离分析结果看,外群与内群的遗传距离平均为 0.317,内群各属间的遗传距离平

均为 0.209,内群各属内的遗传距离平均为 0.132,而种内不同地理种群间的遗传距离平均为 0.013。

如前所述,不同阶元飞虱标本间的遗传距离基本可以区分开来,尤其是种内和种间、内群和外群完全可以区分开来,即可以通过计算遗传距离明确区分上述种类。

2.3 分子系统树

根据测序的结果,以褐飞虱属代表种(褐飞虱)为外群,采用最大简约法(MP)和邻接法(NJ)分别

构建了10种飞虱的分子系统树,得到基本一致的拓扑结构(图1、2),Bootstrap 1 000次检验系统树各支均得到较高的支持率。内群的各属各自构成单系(梯顶飞虱属除外),其中,簇角飞虱属与叶角飞虱属先聚为一支,再与梯顶飞虱属和(或)小头飞虱属相聚;各属内部聚为一支的置信值高达98%(梯顶飞虱属除外),而属间相聚的置信值则普遍较低。

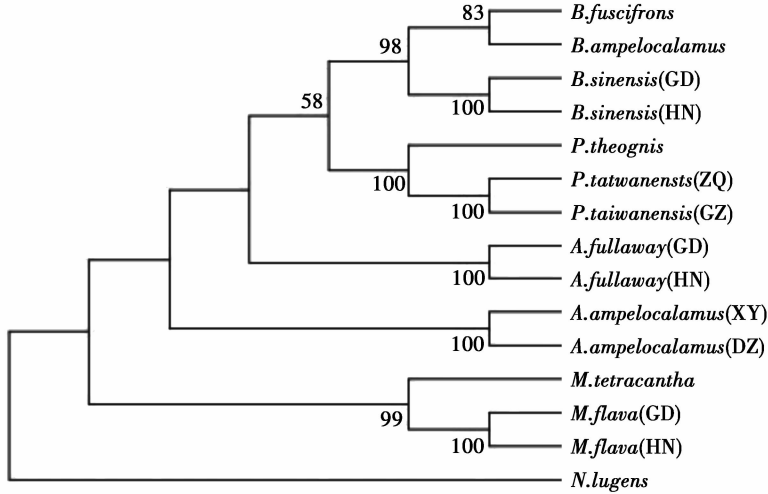


图1 飞虱科10种昆虫 NJ 分子系统树(图中数字为自举检验置信值1 000次)

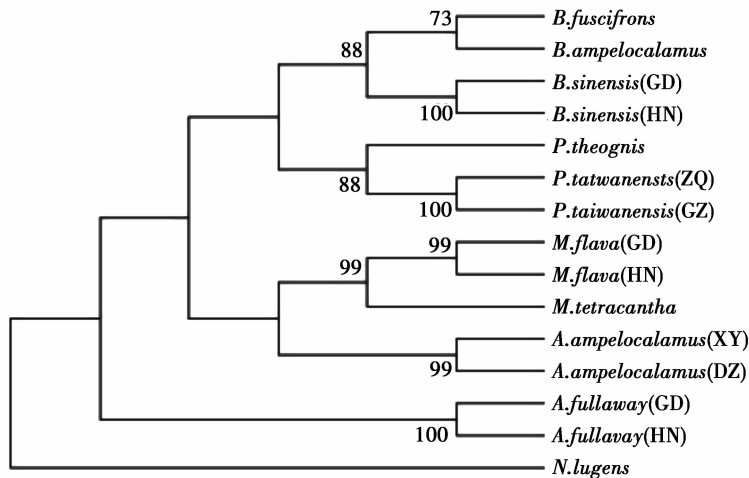


图2 飞虱科10种昆虫 MP 分子系统树(图中数字为自举检验置信值1 000次)

3 讨论

3.1 种上阶元亲缘关系

如前所述,不同属的飞虱基于外形基本可以区分出来,但是同属不同种类的飞虱,尤其是近缘类群仅仅基于外形就很难区分^[1,5,9-10]。

从本文的遗传距离分析结果看,内群各属间和各属内为同一阶元内部不同种飞虱之间的比较,二

者遗传距离平均值(分别为0.209和0.132)与叶文斌等^[12]结论相符,通过计算遗传距离可以基本区分属间和属内的种类。

由图1、2可知:首先,各属飞虱间支序图分支节点的置信值较低,不能以此来评判亲缘关系的远近;其次,各属飞虱基本上各自构成一单系群,唯独梯顶飞虱属2种(梯顶飞虱和爬竹梯顶飞虱没有聚为一支,这可能与梯顶飞虱既取食杂草又取食竹子而爬

竹梯顶飞虱仅取食竹子有关。

3.2 种下阶元亲缘关系

飞虱科中同种但不同地理种群的飞虱有些没有任何差别(如台湾叶角飞虱、中华簇角飞虱和梯顶飞虱),有些则在外形上差异较大(如小头飞虱和爬竹梯顶飞虱)^[6, 11],只有通过解剖外生殖器才能得出结论。

从本文的遗传距离分析结果看,种内不同地理种群间的遗传距离平均值(0.013)远远低于不同种类(属内)之间的遗传距离平均值(0.131),故通过计算遗传距离可以初步判断是否为同一种类。另外,由表2可知,台湾叶角飞虱、中华簇角飞虱和梯顶飞虱各自不同地理种群的遗传距离为0.002,而小头飞虱和爬竹梯顶飞虱各自的不同地理种群的遗传距离分别为0.022和0.035,显然后者不同地理种群之间的区别远大于前者,这一结论与形态学研究相吻合^[6, 11]。

由图1、2可知:同种飞虱各自不同地理种群尽管遗传距离相差较大,但仍然可以聚为一支,即构成一单系群,故根据支序图可以很好的区分不同种类飞虱,进而支持形态学的结论^[6, 11]。

综上所述,本文分析结果完全支持传统分类学的观点,与陈祥盛等^[5-6]、秦道正等^[10]、侯晓晖等^[11]的观点一致,这为今后更多的引入分子手段与传统分类相结合共同解决经典分类无法解决的问题探明道路。

参考文献:

- [1] 丁锦华. 中国动物志(昆虫纲,第四十五卷,同翅目:飞虱科)[M]. 北京:科学出版社,2006:1-776
- [2] 李红荣,杨琳,陈祥盛. 危害竹子的飞虱类昆虫区系及生物地理学初探(半翅目,蜡蝉总科,飞虱科)[J]. 动物分类学报,2010,35(4):806-818
- [3] 陈祥盛. 中国飞虱科系统分类研究(同翅目:蜡蝉总科)[D]. 重庆:西南农业大学,1999:1-291
- [4] 杨琳,陈祥盛,陈会明. 贵州害竹飞虱种类记述[J]. 山地农业生物学报,1999,18(3):154-161
- [5] Chen X S, Yang L, Tsai J H. Revision of the bamboo delphacid genus *Belocera* Muir (Hemiptera: Fulgoroidea: Delphacidae) [J]. Florida Entomologist, 2007a, 90: 674-682
- [6] Chen X S, Yang L, Tsai J H. Review of the bamboo delphacid genus *Arcofacies* (Hemiptera: Fulgoroidea: Delphacidae) from China, with description of one new species [J]. Florida Entomologist, 2007b, 90: 683-689
- [7] 刘明宏,陈祥盛. 贵阳地区竹子飞虱的发生及危害[J]. 贵州农业科学,2008,36(1):87-89
- [8] Chen X S, Tsai J H. Two new genera of Tropidocephalini (Hemiptera: Fulgoroidea: Delphacidae) from Hainan Province, China. Florida Entomologist, 2009, 92(2): 261-268
- [9] 丁锦华,杨莲芳,胡春林. 我国云南害竹飞虱的新属和新种记述(同翅目:飞虱科)[J]. 昆虫学报,1986,29(4):415-425
- [10] Qin D Z, Zhang Y L. A revision of *Malaxella* Ding & Hu (Hemiptera: Delphacidae) with description of a new species [J]. Zootaxa, 2009, 2208: 44-50
- [11] 侯晓晖,陈祥盛. 小头飞虱属2个近缘种的ITS分析[J]. 贵州农业科学,2011,39(11):104-106
- [12] Yeh W B, Yang C T, Hui C F. A Molecular Phylogeny of Planthoppers (Hemiptera: Fulgoroidea) Inferred from Mitochondrial 16S rDNA Sequences [J]. Zoological Studies, 2005, 44(4): 519-535
- [13] 侯晓晖. 飞虱科昆虫分子系统学研究(半翅目:蜡蝉总科)[D]. 贵阳:贵州大学,2010:1-258
- [14] 朴美花,陈学新,何俊华. 膜翅目昆虫干标本的基因组DNA提取[J]. 动物分类学报,2002,27(4):672-676
- [15] Thompson J D, Higgins D G, Gibson D J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. Nucleic Acids Research, 1994, 22: 4673-4680
- [16] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24: 1596-1599