

## 研究论文

# 五种色<sup>1</sup> *Cyt b* 基因序列及其系统发育关系

刘菲<sup>1\*</sup> 张大治<sup>2</sup> 郑哲民<sup>3\*\*</sup>

(1. 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所 上海 200023; 2. 宁夏大学生命科学学院 宁夏 银川 750021; 3. 陕西师范大学动物研究所 陕西 西安 710062)

**Analysis of *cyt b* gene sequences and molecular phylogeny of five species of Calopterygidae.** LIU Fei<sup>1\*</sup>, ZHANG Da-Zhi<sup>2</sup>, ZHENG Zhe-Min<sup>3\*\*</sup> (1. *Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China*; 2. *College of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan 750021, China*; 3. *Institute of Zoology, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710062, China*)

**Abstract** The nucleotide composition and phylogenetic relationship among 5 species in Calopterygidae were studied based on the 576 bp sequences of *cyt b* gene. The results showed that the average contents of T, C, A and G are 31.6%, 21.6%, 31.4% and 15.4%, respectively. The content of A+T (63%) is obviously higher than that of G+C (37%), reaching up to 66.4% at the third position of the codons. Nucleotide substitution most likely occurs at the third position. With *Bayadera melanopteryx* as outgroup, the phylogenetic trees shows that *Mnais* and *Matrona* are monophyletic, but *Mnais*, differentiated earlier from their common ancestor, is a sister group to *Matrona*, *Vestalis* and *Neurobasis*.

**Key words** *cyt b* gene, mtDNA, phylogenetic relationship, Calopterygidae, Odonata

**摘要** 以昆虫 mtDNA 的 *Cyt b* 基因作为分子遗传标记, 用其特异性引物进行 PCR 扩增及 DNA 测序, 共获得蜻蜓目束翅亚目色<sup>1</sup>科 4 属 5 种及 1 外群的 *Cyt b* 基因部分序列(576 bp), 该片段中碱基 T, C, A, G 的平均含量分别为 31.6% 21.6% 31.4% 和 15.4%, A+T 平均含量为 63%, 明显高于 G+C 含量(37%)。密码子第 3 位点的 A+T 平均含量较高, 为 66.4%。碱基替换多发生在密码子的第 3 位点。以巨齿尾溪<sup>2</sup> *Bayadera melanopteryx* 作为外群构建系统发育树, 结果显示, 绿色<sup>3</sup>属 *Mnais* 和单脉色<sup>4</sup>属 *Matrona* 是单系群, 绿色<sup>3</sup>属是单脉色<sup>4</sup>属、细色<sup>5</sup>属 *Vestalis* 及艳色<sup>6</sup>属 *Neurobasis* 的姐妹群, 是较早分化出来的一个类群。

**关键词** *Cyt b*, 线粒体 DNA, 系统发育, 色<sup>1</sup>科, 蜻蜓目

蜻蜓目 Odonata 是一类比较古老的昆虫, 全世界目前已知约 5 300 多种<sup>[1]</sup>, 包括差翅亚目、束翅亚目和间翅亚目 3 个亚目, 估计约为 10 000 种左右<sup>[2]</sup>。我国目前已知 610 多种<sup>[3]</sup>。近年现代生物技术在蜻蜓研究中得到应用, 已经获得应用的标记主要有酯酶同工酶电泳、核酸序列分析、AFLP、RAPD、以及核酸探针等<sup>[4]</sup>。双链环状分子线粒体 DNA (mtDNA), 由于结构简单, 序列和组成一般比较保守、易于操作、母系遗传、无重组、单拷贝、与核 DNA 相比较小等特点而获得广泛应用<sup>[5~14]</sup>。昆虫线粒体 DNA 包括

13 个编码蛋白质的基因, 其中细胞色素 b (*Cyt b*) 是目前结构和功能研究最为清楚的基因之一<sup>[15, 16]</sup>。目前, 国外应用于蜻蜓目系统发育关系研究的 mtDNA 有 16S rDNA, CO I, CO II, *Cyt b* 和 12S rDNA 基因。国内仅见张大治基于 *Cyt b* 基因对差翅亚目部分种类的研究<sup>[17]</sup>, 而对束翅亚目 *Cyt b* 基因序列研究尚属空白。

本研究以 *Cyt b* 基因作为分子遗传标记,

\* E-mail: lufeisuan@njn@163.com

\*\* 通讯作者, zhengzhemin@163.com

首次对束翅亚目色蠹总科色蠹科的 4 属 5 种昆虫的线粒体基因进行特异性扩增和序列测定,并以溪蠹科 Epallagidae 的巨齿尾溪蠹 *Bayadera melanopteryx* 为外群,构建分子系统树,以便为深入研究束翅亚目昆虫提供分子生物学的证据和资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试材料用无水乙醇浸泡并在  $-20^{\circ}\text{C}$  低温条件下保存,实验所得的各种类的 *Cyt b* 基因部分序列均已在 GenBank 登录(表 1)。

表 1 供试材料名称及来源

科名	种类	采集地	采集日期(年-月-日)	GenBank 登录号
色蠹科 Colytarygidae	华艳色蠹 <i>Neurobasis chinensis</i>	云南昆明	2004-7-26	DQ499014
	多横细色蠹 <i>Vestalis gracilis</i>	云南勐腊	2004-7-27	DQ499015
	透顶单脉色蠹 <i>Matrona basilaris</i>	陕西镇巴	2003-7-30	DQ499013
	黄翅绿色蠹 <i>Mnais auripennis</i>	陕西佛坪	2004-5-29	DQ499012
溪蠹科 Epallagidae	亮翅绿色蠹 <i>Mnais maclachlani</i>	陕西平利	2003-7-24	AY960599
	巨齿尾溪蠹 <i>Bayadera melanopteryx</i>	陕西镇平	2004-7-21	DQ499011

### 1.3 PCR 扩增 *Cyt b* 基因片段

用于扩增的目的基因是线粒体 *Cyt b* 基因片段,采用 1 对昆虫特异性引物进行 PCR 扩增,引物设计参考 Simmons 等<sup>[19]</sup>,由上海生工生物工程有限公司合成。引物序列为: 5'-TGA GGA CAA ATA TCA TTT TGA GGW -3'(24bp)和 5'-ACT GGT CGA GCT CCA ATT CAT GT-3'(23 bp)。扩增体积为 50  $\mu\text{L}$ 。反应体系为: 10 $\times$  缓冲液 5.0  $\mu\text{L}$ , 25 mmol/L 的  $\text{MgCl}_2$  4.0  $\mu\text{L}$ , 10 mmol/L dNTPs 1.0  $\mu\text{L}$ , 10 pmol/L 的 1 对引物各 1.5  $\mu\text{L}$ , 约 20~50 ng/ $\mu\text{L}$  的模板 DNA 2.0  $\mu\text{L}$ , 2.5  $\mu\text{L}$  的 Taq DNA 聚合酶 0.4  $\mu\text{L}$ , 加入无菌三蒸水至 50  $\mu\text{L}$ 。

扩增条件为  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min 后,按下列参数进行 35 个循环:  $94^{\circ}\text{C}$  变性 1 min,  $50^{\circ}\text{C}$  退火 1 min,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 最后 1 个循环后,  $72^{\circ}\text{C}$  再延伸 7 min,  $4^{\circ}\text{C}$  保存。扩增产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测,对扩增效果良好的样品委托上海博亚公司进行纯化和测序,所有样品均进行双向测序,以保证序列的精确性。

### 1.2 基因组 DNA 的提取

对基因组总 DNA 采用酚/氯仿抽提法<sup>[18]</sup>,取一定量(50~100 mg)的蜻蜓的飞行肌加入 600  $\mu\text{L}$  的匀浆缓冲液(由 A 液 0.5 mol/L NaCl、0.1 mol/L  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ 、0.05 mol/L Tris, pH=8.5、B 液 5% 的 SDS 和 C 液 2 mg/mL 的蛋白酶 K 按 8:1:1 组成)充分研磨后在  $65^{\circ}\text{C}$  的水浴锅中恒温水浴 4~6 h,用饱和 Tris 平衡酚、CI 液(氯仿、异戊醇混合液 24:1)抽提,用无水乙醇沉淀并洗涤所提取的 DNA,使其在自然状态下干燥,干燥后的 DNA 以无菌的三蒸水溶解,于  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用,如果长期保存可转入  $-20^{\circ}\text{C}$  冷藏。

### 1.4 DNA 序列数据处理

所测序列数据经过正反义链互补校正,并在 GenBank 中进行“BLAST”相似性搜索,以确保扩增所得序列的准确性和可靠性。将所得的序列用 CLUSTAL X (1.81) 软件进行序列比对。用 MEGA 3.0<sup>[20]</sup> 统计核苷酸的使用频率、转换及颠换数、计算遗传距离、进行碱基替换饱和度分析等,在 Kimura-2-parameter 模型的基础上,用邻接法(neighbor-joining method, NJ)和最大简约法(maximum-parsimony method, MP)构建分子系统树,对空位采用完全删除(complete deletion),并用“bootstrap”1 000 次自举检测表明各分支的置信度。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Cyt b* 基因序列组成及变异

实验获得了色蠹科 5 个种的 *Cyt b* 基因的部分序列片段,去除引物序列长度共计 576 bp,在 576 bp 长度的核苷酸序列中,共检测到有 233 个变异位点(保守位点 343 个),约占核苷酸

总数的 42.5%，其中简约信息位点 136 个，自裔位点 97 个，多数变异发生在密码子的第 3 位，约占 62.7%，第 2 位点最少，仅占 10.3%。T, C, A 和 G 的含量分别为 31.6, 21.6, 31.4 和 15.4%。A+T 平均含量为 63%，G+C 含量为 37%，A+T 平均含量明显高于 G+C 含量。就每个氨基酸密码子来看，第 3 位点的 A+T 平均含量也较高，达到 66.4%。

统计两两序列间的碱基替换数和序列差异百分比(表 2)，总体上看，序列间转换大于颠换。统计表明：不同密码子位点的核苷酸替换表现出了差异，尤其在密码子第 3 位点，转换与颠换发生的频率都较高，转换的发生占所有转换总数的 59.7%，颠换占总颠换的 67.2%。颠换主要发生在 A 与 T 之间，转换主要是 T 与 C 之间的转换，序列间 TS/TV 值最高为 1.581，最低为 1.187。

表 2 碱基转换数/颠换数(下三角)和序列差异百分比(上三角)

	1	2	3	4	5	6
1 <i>Neurobasis chinensis</i>		0.222	0.219	0.285	0.283	0.234
2 <i>Vestalis gracilis</i>	74/54		0.234	0.285	0.290	0.233
3 <i>Matrona basilaris</i>	69/57	80/55		0.278	0.278	0.219
4 <i>Mnais auripennis</i>	93/71	89/75	98/62		0.009	0.264
5 <i>Mnais maclachlani</i>	92/71	92/75	98/62	5/0		0.267
6 <i>Bayadera melanopteryx</i>	71/64	70/64	65/61	77/75	79/75	

### 2.2 遗传距离

依据 2 种分子模型 Kimura-2 参数模型、Jukes-Cantor 模型计算种间遗传距离(表 3)，得到的 2 种遗传距离矩阵反映的遗传距离基本一致。结果表明，属内种间的遗传距离明显要小于属间的遗传距离，绿色色螽属 2 种蜻蜓之间遗传距离最小，仅为 0.009，属间遗传距离平均为 0.326。

### 2.3 系统进化树

基于 *Cyt b* 基因序列，以巨齿尾溪色螽 *Bayadera melanopteryx* 为外群，Bootstrap 1 000 次检验各支的置信度，采用邻接法(NJ)和最大简约法(MP)构建分别构建色螽科 5 种昆虫的分子系统树(图 1, 图 2)。从 NJ 树和 MP 树的拓扑

结构看，这 2 种聚类方法结果基本一致，大体上出现了 2 个聚类簇，首先是艳色色螽属 *Neurobasis* 的华艳色色螽与细色色螽属 *Vestalis* 的多横细色色螽优先相聚，然后与单脉色色螽属 *Matrona* 的透顶单脉色色螽相聚构成第 I 聚类簇，绿色色螽属 *Mnais* 的黄翅绿色色螽和亮翅绿色色螽以 100% 的置信度相聚构成聚类簇 II。在这 4 属中，艳色色螽属位于系统树的最顶端，是相对比较进化的类群，绿色色螽属位于系统树的基部，是较早分化出来的 1 个类群。

表 3 5 种色螽种间遗传距离(下三角为 Jukes Cantor 距离，上三角为 Kimura-2 距离)

	1	2	3	4	5	6
1 <i>Neurobasis chinensis</i>		0.268	0.262	0.366	0.363	0.284
2 <i>Vestalis gracilis</i>	0.264		0.287	0.365	0.374	0.281
3 <i>Matrona basilaris</i>	0.259	0.281		0.358	0.358	0.261
4 <i>Mnais auripennis</i>	0.358	0.358	0.347		0.009	0.329
5 <i>Mnais maclachlani</i>	0.355	0.367	0.347	0.009		0.335
6 <i>Bayadera melanopteryx</i>	0.281	0.278	0.259	0.325	0.331	

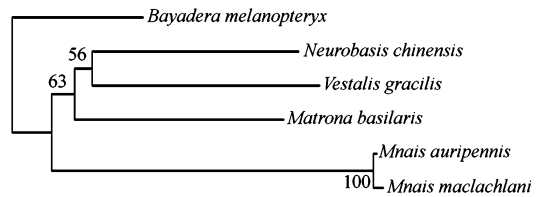


图 1 5 种色螽的 NJ 分子系统树

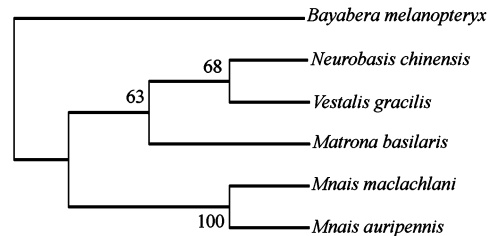


图 2 5 种色螽的 MP 分子系统树

### 3 讨论

本研究结果表明，4 属 5 种色螽的 A+T 平均含量(63%)明显高于 G+C 含量(37%)，这与其它大多数昆虫的研究结果基本一致，但与某些昆虫相比含量偏低<sup>[21~23]</sup>。密码子的第 3

位点 A+T 含量高达 66.4%，反映出 *Cyt b* 基因在密码子的使用上具有偏向性。从碱基替换的结果看，密码子第 3 位点的替换频率显著高于前 2 个位点，这与密码子第 3 位点承担较小的进化压力，发生的碱基替换多为同义替换有关。颠换主要发生在 A 与 T 之间，为 52.5%；转换主要是 T 与 C 之间的转换，为 61%。实验所得 576 bp 的序列共编码 192 个氨基酸，其中有 58 个发生了变异，占总数的 30.2%。Crozier 等通过对高 A+T 与氨基酸序列关系的广泛研究，认为高 A+T 与氨基酸序列变异没有显著的相关性<sup>[21]</sup>；Desalle 等认为高 A+T 增加了 AT 颠换的可能性，因而导致了第 3 位点颠换速率增加<sup>[24]</sup>。Hugall 也认为高 A+T 含量加速了氨基酸的变异<sup>[23]</sup>。本研究所揭示的 5 种色 昆虫 *Cyt b* 基因序列中的高 A+T 与氨基酸序列变异之间的关系还有待深入研究。

在外群的选择上，根据所选外群尽可能与研究类群有最密切亲缘关系，并且是所研究的单系群以外种的观点<sup>[13]</sup>，我们选取了比色 科单系群起源关系较近的且相对古老<sup>[26]</sup>的溪 科昆虫作为外群。

目前，对束翅亚目是单系群还是并系群仍处在争论之中<sup>[27]</sup>。色 科是束翅亚目中较大的科，对其形态学、行为学、生态学及分子生物学等方面的研究主要集中在色 属 *Calopteryx*<sup>[28, 29]</sup>。在分子生物学方面，Misof 等用线粒体 DNA 的 16S rDNA 研究了色 科部分属的系统发育关系，指出色 属、单脉色 属、绿色 属都是单系群<sup>[28]</sup>。用 *Cyt b* 对束翅亚目进行分子系统学研究仅见于 Chippindale 等利用 mtDNA 的包括 *Cyt b*、CO II 和 12SrDNA 3 种序列（总 1 长度为 1 205 bp）对采自北美的 科异痣属 (*Ischnura*) 的 16 种豆娘进行的系统发育研究<sup>[30]</sup>。本研究用 *Cyt b* 基因序列也进一步支持了绿色 属和单脉色 属是单系群的观点。从系统树可以看出，绿色 属是单脉色 属、细色 属及艳色 属的姐妹群，单脉色 属是细色 属和艳色 属的姐妹群。当然要对比色 科各属间的系统关系作出更为合理的解释，需要

增大种属级分类单元的扩展研究，以增强分类单元的代表性，从而得出比较确切的结论。

### 参 考 文 献

- 1 Bridge C. A. Catalogue of the Family-group, Genus-group and Species-group Names of the Odonata of the World (3rd ed.). Published Privately, Urbana, Illinois, 1994.
- 2 Temmessen J. K. *Entomol. News.*, 1997, **108**(2): 122~126.
- 3 Hua L. Z. List of Chinese Insects. Zhongshan University Press, Guangzhou, 2000. 6~15.
- 4 张大治, 郑哲民. 昆虫知识, 2005, **42**(2): 123~127.
- 5 代金鑫, 郑哲民. 昆虫知识, 2005, **42**(4): 395~399.
- 6 陈永久, 张亚平. 遗传学报, 1999, **26**(3): 203~207.
- 7 任竹梅, 马恩波, 郭亚平. 遗传学报, 2002, **29**(4): 314~321.
- 8 邵志勇, 茅红新. 动物学研究, 2002, **23**(5): 361~366.
- 9 张亚平, 施立明. 动物学研究, 1992, **13**(3): 289~298.
- 10 王备新, 杨莲芳. 昆虫知识, 2002, **39**(2): 88~92.
- 11 程家安, 唐振华. 昆虫分子科学. 北京: 科学出版社, 2001. 1~44.
- 12 黄原. 分子系统学—原理、方法及应用. 北京: 中国农业出版社, 1998. 193~221.
- 13 龚鹏, 杨效文, 谭声江, 陈晓峰. 昆虫知识, 2001, **38**(2): 86~91.
- 14 卜云, 郑哲民. 昆虫知识, 2005, **42**(1): 18~22.
- 15 Gray M. W. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 1989, **5**: 25~50.
- 16 Moritz C., Dowling T. E., Brown W. M. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 1987, **18**: 269~292.
- 17 张大治. 陕西师范大学硕士学位论文, 2005.
- 18 张大治, 戴沛捷. 宁夏农学院学报, 2004, **25**(3): 10~12.
- 19 Simmons R. B., Weller S. J. *Mol. Phy. Evol.*, 2001, **20**(2): 196~210.
- 20 Kumar S., Tamura K., Nei M. *Brief. Bioinform.*, 2004, **5**: 150~163.
- 21 Crozier R. H., Crozier Y. C. *Mol. Biol. Evol.*, 1992, **9**: 474~482.
- 22 Crozier R. H., Crozier Y. C. *Genetic*, 1993, **133**: 97~117.
- 23 Clary D. O., Wolstenholme D. R. *J. Mol. Evol.*, 1985, **22**: 252~271.
- 24 Desalle R., Freedman T., Prager E. M. *J. Mol. Evol.*, 1987, **26**: 157~164.
- 25 Hugall A., Stanton J., Moritz C. *Mol. Biol. Evol.*, 1997, **14**(1): 40~48.
- 26 Tillyard R. J., Fraser F. C. *Austral. Zool.*, 1940, **9**(4): 359~396.
- 27 Bechly G. H. P. Inemet website <http://www.bechly.de/phylosys.htm> developed and maintained by the author. 2005.
- 28 Misof B., Anoderon C. L., Hardys H. *Mol. Phy. Evol.*, 2000, **15**(1): 5~14.
- 29 Weekers P. H. H., Johan F., Jonckheere D., Dumont J. H. *Mol. Phy. Evol.* 2001, **20**(1): 8.
- 30 Chippindale P. T., Dave V. K., Whitmore D. H., Robinson J. V. *Mol. Phy. Evol.*, 1999, **11**(1): 10~121.