研究论文

五种色[illegible] *Cyt b* 基因序列及其系统发育关系

刘　菲[1*]　张大治[2]　郑哲民[3**]

(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[1*], ZHANG Da-Zhi[2], ZHENG Zhe-Min[3**] (1. *Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciecnes*, 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[illegible]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[illegible] *Bayadera melanopteryx* 作为外群构建系统发育树,结果显示,绿色[illegible]属 *Mnais* 和单脉色[illegible]属 *Matrona* 是单系群,绿色[illegible]属是单脉色[illegible]属、细色[illegible]属 *Vestalis* 及艳色[illegible]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[illegible]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[1],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[2]。我国目前已知610 多种[3]。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[4]。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[5~14]。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[15,16]。目前,国外应用于蜻蜓目系统发育关系研究的mtDNA 有16S rDNA, COⅠ, COⅡ, *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[17],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: liufeisuanjinjin@163.com

** 通讯作者, zhengzhemin@163.com

收稿日期: 2006-04-29, 修稿日期: 2006-06-26

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.n

首次对束翅亚目色蟌总科色蟌科的4属5种昆虫的线粒体基因进行特异性扩增和序列测定，并以溪蟌科 Epallagidae 的巨齿尾溪蟌 *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 ℃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)。

1.2 基因组 DNA 的提取

对基因组总 DNA 采用酚/氯仿抽提法[18]，取一定量(50～100 mg)的蜻蜓的飞行肌加入600 μL 的匀浆缓冲液(由 A 液 0.5 mol/L NaCl、0.1 mol/L Na_2EDTA、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 ℃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 ℃冰箱保存备用，如果长期保存可转入－20 ℃冷藏。

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
色蟌科	华艳色蟌 *Neurobasis chinensis*	云南昆明	2004-7-26	DQ499014
Calopterygidae	多横细色蟌 *Vestalis gracilis*	云南勐腊	2004-7-27	DQ499015
	透顶单脉色蟌 *Matrona basilaris*	陕西镇巴	2003-7-30	DQ499013
	黄翅绿色蟌 *Mnais auripennis*	陕西佛坪	2004-5-29	DQ499012
溪蟌科	亮翅绿色蟌 *Mnais maclachlani*	陕西平利	2003-7-24	AY960599
Epallagidae	巨齿尾溪蟌 *Bayadera melanopteryx*	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[19]，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 μL。反应体系为：10× 缓冲液 5.0 μL，25 mmol/L 的 $MgCl_2$ 4.0 μL，10 mmol/L dNTPs 1.0 μL，10 pmol/μL 的1对引物各1.5 μL，约 20～50 ng/μL 的模板 DNA 2.0 μL，2.5 μL 的 Taq DNA 聚合酶0.4 μL，加入无菌三蒸水至50 μL。

扩增条件为 94 ℃预变性 4 min 后，按下列参数进行 35 个循环：94 ℃变性 1 min，50 ℃退火 1 min，72 ℃延伸 1 min，最后 1 个循环后，72 ℃再延伸 7 min，4 ℃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。

1.4 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 MEGA3.0[20] 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 meithod，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

实验获得了色蟌科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

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

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 *Neurobasis chinensis*		0.222	0.219	0.285	0.283	0.234
2 *Vestalis gracilis*	74/54		0.234	0.285	0.290	0.233
3 *Matrona basilaris*	69/57	80/55		0.278	0.278	0.219
4 *Mnais auripennis*	93/71	89/75	98/62		0.009	0.264
5 *Mnais maclachlani*	92/71	92/75	98/62	5/0		0.267
6 *Bayadera melanopteryx*	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, 绿色䗛属 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, 以巨齿尾溪䗛 *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)构建分别构建色䗛科 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, 首先是艳色䗛属 *Neurobasis* 的华艳色䗛与细色䗛属 *Vestalis* 的多横细色䗛优先相聚, 然后与单脉色䗛属 *Matrona* 的透顶单脉色䗛相聚构成第 I 聚类簇, 绿色䗛属 *Mnais* 的黄翅绿色䗛和亮翅绿色䗛以 100% 的置信度相聚构成聚类簇 II。在这 4 属中, 艳色䗛属位于系统树的最顶端, 是相对比较进化的类群, 绿色䗛属位于系统树的基部, 是较早分化出来的 1 个类群。

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

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

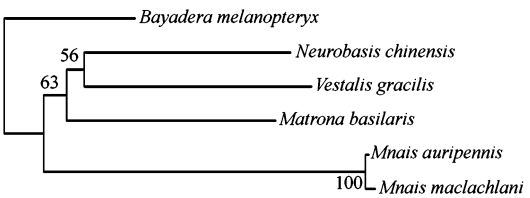

图 1　5 种色䗛的 NJ 分子系统树

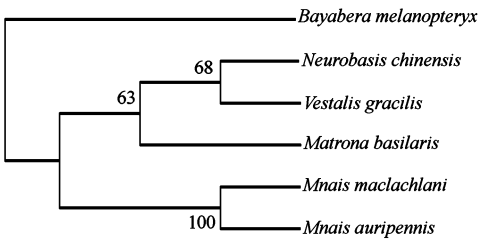

图 2　5 种色䗛的 MP 分子系统树

3　讨论

本研究结果表明, 4 属 5 种色䗛的 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[21~23]。密码子的第 3

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.n

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[21]；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[24]。Hugall 也认为高 A+T 含量加速了氨基酸的变异[25]。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[12]，我们选取了比色 科单系群起源关系较近的且相对古老[26]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[27]。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*[28,29]。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[28]。用 *Cyt b* 对束翅亚目进行分子系统学研究仅见于 Chippindalel 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[30]。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。当然要对色 科的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 edu.). Pubilished Privalely. Urbana. Illinos, 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 代金霞，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. Zoll.*, 1940, **9**(4): 359～396.
27 Bechly G. H. P. Inernet website http://www.bechly.de/phylosys.htm developed and maintained by the author: 2005.
28 Misof B., Anoderson C. L., Hardrys 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.

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n