



双带麻蠡线粒体基因组全序列特征及系统发育研究^{*}

刘 菲^{**} 张蓝伊 化文平 李 佳 苑志敏 王立志^{***}

(陕西学前师范学院生物食品与化学学院, 秦岭药食同源生物资源保育及利用重点实验室, 西安 710061)

摘 要 【目的】深入了解双带麻蠡 *Tapiena bivittata* 线粒体基因组的特征, 揭示其与其他露蠡亚科 Phaneropterinae 昆虫的亲缘关系, 进一步理解该亚科的系统发育关系, 本研究对双带麻蠡的线粒体基因组进行了测序和分析, 并探讨了其系统发育地位。【方法】利用高通量测序技术测定双带麻蠡线粒体全基因组序列, 完成拼接、注释和分析。基于测定的双带麻蠡线粒体基因组序列和已报道的露蠡亚科 21 种昆虫的线粒体基因组序列, 分别提取 13 个蛋白质编码基因和 2 个 rRNA 基因, 利用贝叶斯法构建露蠡亚科的系统发育关系。【结果】双带麻蠡线粒体全基因组长度为 16 414 bp, 包含 13 个蛋白质编码基因、22 个 tRNA 基因、2 个 rRNA 基因和 1 个控制区。其基因排列紧凑, 且与昆虫祖先序列的基因排序一致。双带麻蠡线粒体基因组的 A+T 含量为 69.7%。在 13 个蛋白编码基因中, 除 *COX1* 和 *ND1* 以 TTG 为起始密码子外, 其余均为 ATN; 除 *COX2*、*COX3*、*ND5* 和 *ND4* 使用不完整的终止密码子 T 外, 其余均以 TAG 或 TAA 作为终止信号。22 个 tRNA 中, 除 tRNA^{Ser(AGN)} 外, 其余均为典型的三叶草结构。贝叶斯系统发育树显示, 双带麻蠡与糙颈蠡属 *Ruidocollaris* 的 3 个物种——凸翅糙颈蠡 *Ruidocollaris convexipennis*、污翅糙颈蠡 *Ruidocollaris obscura* 和中华糙颈蠡 *Ruidocollaris sinensis* 聚为一支, 表明其与糙颈蠡属的亲缘关系最近。【结论】本研究成功获得了双带麻蠡的完整线粒体基因组序列, 首次揭示了其结构与组成特征, 并利用线粒体基因组数据构建了露蠡亚科的系统发育树, 为进一步研究露蠡亚科的系统进化和完善其分类系统提供了新的分子数据支撑。

关键词 双带麻蠡; 线粒体基因组; 露蠡亚科; 蠡斯科; 直翅目; 系统发育

The complete sequence characteristics and phylogeny of the mitochondrial genome of *Tapiena bivittata*

LIU Fei^{**} ZHANG Lan-Yi HUA Wen-Ping LI Jia YUAN Zhi-Min WANG Li-Zhi^{***}

(Key Laboratory of Qinling Medicinal and Edible Biological Resources Conservation and Utilization, College of Biology, Food and Chemistry, Shaanxi Xueqian Normal University, Xi'an 710061, China)

Abstract [Aim] To describe the mitochondrial genome characteristics of *Tapiena bivittata*, and clarify its phylogenetic relationships with other members of the Phaneropterinae. [Methods] The complete mitochondrial genome of *T. bivittata* was first sequenced using next-generation sequencing technology, then assembled, annotated, and analyzed. Based on the mitochondrial genome sequence of *T. bivittata* and the published mitochondrial genomes of 21 Phaneropterinae species, 13 protein-coding genes and 2 rRNA genes were extracted. Bayesian inference was used to reconstruct phylogenetic relationships within the subfamily. [Results] The complete mitochondrial genome length of *T. bivittata* is 16 414 bp, and is comprised of 13 protein-coding genes, 22 tRNA genes, 2 rRNA genes, and 1 control region. The gene arrangement is compact and consistent

*资助项目 Supported projects: 陕西基础科学研究院科研计划项目 (23JHQ024); 陕西省大学生创新创业训练计划项目 (S202514390099); 陕西省教育厅科研计划项目 (24JK0390); 陕西高校青年创新团队“秦岭药食同源生物资源保护与利用创新团队”

**第一作者 First author, E-mail: liufeisuanjinjin@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: rj_wl@126.com

收稿日期 Received: 2025-03-04; 接受日期 Accepted: 2025-06-07

with that of the ancestral gene. The A+T content of the mitochondrial genome is 69.7%. With the exception of *COX1* and *ND1*, which use TTG as the start codon, the remainder of the 13 protein-coding genes use ATN. All genes use TAG or TAA as termination signals, except for *COX2*, *COX3*, *ND5*, and *ND4*, which use the incomplete stop codon T. With the exception of tRNA^{Ser(AGN)}, all other 22 tRNAs have a typical cloverleaf structure. **[Conclusion]** The complete mitochondrial genome sequence of *T. bivittata* was successfully obtained. A Bayesian phylogenetic tree indicates that *T. bivittata* is most closely related to three species of the genus *Ruidocollaris*: *Ruidocollaris convexipennis*, *Ruidocollaris obscura*, and *Ruidocollaris sinensis*.

Key words *Tapiena bivittata*; mitochondrial genome; Phaneropterinae; Tettigoniidae; Orthoptera; phylogeny

露螽亚科 Phaneropterinae 作为直翅目 Orthoptera 螽斯科 Tettigoniidae 中最大的一个亚科,其种类繁多且分布广泛,尤其在温带和热带区域(刘春香, 2005)。截止 2025 年 1 月,直翅目物种名录(The Orthoptera species file, OSF)共记录露螽亚科昆虫 49 族 382 属 2 892 种。该亚科物种对生态环境敏感,是重要的生态指示类群,尤其在横断山区和青藏高原东缘地区具有高特有性(马婷婷, 2011)。此外,露螽亚科在动物区系和生物多样性中占有重要地位,且因其复杂的鸣声行为,成为国际学术界研究行为学的理想对象(刘春香, 2005)。

露螽亚科的系统分类研究长期以形态学方法为主导,早期学者通过外部形态特征完成了多个属的修订和新种鉴定(Nickle, 1984; Spooner, 1986, 1988; 李娜, 2008; Battiston and Fontana, 2024),并对其地理分布格局展开了初步探讨(刘春香, 2005)。近年来分子系统学的介入为分类学研究引入新视角,研究者开始运用线粒体基因组(Mitogenome)等分子标记开展系统发育分析。这类环状双链 DNA 分子(14-18 kb)包含 13 个蛋白质编码基因(Protein-coding genes, PCGs)、2 个核糖体 RNA 基因(Ribosomal RNA, rRNA)及 22 个转运 RNA 基因(Transfer RNA, tRNA),其高度保守性和母系遗传特性使其成为解析昆虫进化关系的重要工具(Liu and Qiu, 2016; 常会会等, 2018; Liu, 2018, 2019; 赵乐等, 2018; Liu and Li, 2020; 刘菲等, 2023)。目前已有研究通过多基因联合分析揭示了露螽亚科部分属间和属内的亲缘关系(马婷婷, 2011; 邱忠营, 2016),同时在线粒体基因组结构变异方面取得突破性发现,包括新型基因排列模式的识别(刘菲, 2016,

2017)和控制区序列的扩张现象(刘菲, 2016),这些成果为构建更精准的系统发育框架奠定了基础(邱忠营等, 2020; 刘静和边迅, 2021; 刘静, 2022)。

作为露螽亚科的重要代表物种,双带麻螽 *Tapiena bivittata* 相关研究在不同领域存在显著差异。虽然其形态特征已获详尽描述(石福明和袁井峰, 2001),且作为农业害虫的生态危害性被广泛认知,但分子层面的研究仍存在显著空白。针对该物种进行线粒体基因组特征及系统进化地位的探索,将有助于突破传统分类学的局限性,为厘清露螽亚科物种分化机制提供新的分子证据。本研究将通过线粒体基因组序列的测序和分析,探讨其在露螽亚科中的系统进化地位,为双带麻螽乃至露螽亚科的系统进化研究提供新的视角和数据支持。

1 材料与方法

1.1 双带麻螽基因组测序及线粒体基因组组装

本研究所用的双带麻螽样本采自广西桂林市兴安县。使用 Illumina Truseq™ DNA Sample Preparation Kit,从单只标本的后足股节肌肉中提取基因组 DNA,提取的 DNA 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳与 NanoDrop 进行质量检测。质量合格的 DNA 样本经超声波处理随机打断为短片段,用于构建测序文库。最终使用 Illumina HiSeq 平台对质检合格的文库进行双端测序。获得的原始测序数据(Raw reads)首先利用 CLC Genomics Workbench 9.0 进行质控过滤,以获得高质量读取片段(Clean reads)。随后以近缘物种污翅糙颈螽 *Ruidocollaris obscura* (GenBank 登录号:

NC_028160) 的线粒体基因组为参考, 采用 Mira 4.0.2 与 MITObim 1.9.1 软件进行拼接与组装, 最终获得双带麻蠡线粒体基因组的完整环状序列 (Hahn *et al.*, 2013)。

1.2 双带麻蠡线粒体基因组序列注释及分析

使用 Geneious Prime 2022.2.2 对组装得到的双带麻蠡线粒体基因组进行注释, 界定各基因的起止位点、转录方向以及长度。对于蛋白质编码基因, 进一步识别其起始和终止密码子, 并统计基因间隔区的长度。利用 Organellar Genome DRAW (OGDRAW) 1.3.1 (<https://chlorobox.mpimp-golm.mpg.de/OGDraw.html>) 绘制双带麻蠡线粒体基因组结构图 (Greiner *et al.*, 2019)。

运用 Geneious Prime 2022.2.2 软件的 Extract Annotations 功能, 将双带麻蠡线粒体基因组中的蛋白质编码基因、tRNA 基因、rRNA 基因以及控制区序列分别进行提取。通过该软件的 Nucleotide Statistics 工具, 对整个线粒体基因组、蛋白质编码基因、tRNA 基因、rRNA 基因和控制区的碱基组成和数目进行统计分析。将蛋白质编码基因序列导入 Mega 11.0 软件, 利用其 Statistics 功能下的 Nucleotide Composition 模块, 对蛋白质编码基因的密码子第一位、第二位和第

三位的碱基组成和数目进行统计。通过 Data 菜单下的 Translate Sequences 选项, 将核苷酸序列翻译为蛋白质序列, 并进一步通过 Statistics 的 Codon usage 功能, 分析蛋白质编码基因的密码子使用频次和相对同义密码子使用度 (Relative synonymous codon usage, RSCU), 并通过 Amino acid composition 模块统计氨基酸的使用频率。

将双带麻蠡的线粒体基因组数据以 fasta 格式上传至 Galaxy 平台 (<https://usegalaxy.org/>)。在该平台上, 应用 MITOS 2 在线分析工具, 对双带麻蠡线粒体基因组中的 tRNA 和 rRNA 基因的位置及其二级结构进行预测。预测时选择无脊椎动物的遗传编码 (Genetic code) 设置, 并采用默认的 RefSeq63 Metazoa 作为参考数据。最终选择 BED 和 ncRNA structure plots-svg 作为输出结果。

1.3 露蠡亚科系统发育树构建

为构建露蠡亚科的系统发育树, 本研究选取了从 GenBank 数据库获取的 21 个露蠡亚科物种的线粒体基因组序列、新测序的双带麻蠡线粒体基因组, 以及 2 个蛭蠡亚科 Meconematinae 物种的线粒体基因组序列 (外群), 共计 24 条线粒体基因组序列 (表 1)。

表 1 本研究所用的线粒体基因组数据
Table 1 Mitochondrial genome data in this study

亚科 Subfamily	属名 Genus	物种名 Species	GenBank 登录号 GenBank accession no.	线粒体基因组全长 (bp) Complete mitochondrial genome length (bp)
露蠡亚科 Phaneropterinae	华绿蠡属 <i>Sinochlora</i>	长裂华绿蠡 <i>Sinochlora longifissa</i>	KC467055	18 133
		侧反华绿蠡 <i>Sinochlora retrolateralis</i>	KC467056	17 209
		四川华绿蠡 <i>Sinochlora szechwanensis</i>	KX354724	18 051
		中华华绿蠡 <i>Sinochlora sinensis</i>	MK903598	17 033
		糙颈蠡属 <i>Ruidocollaris</i>		
		中华糙颈蠡 <i>Ruidocollaris sinensis</i>	MT849268	16 416
		凸翅糙颈蠡 <i>Ruidocollaris convexpennis</i>	MN083188	16 437
		污翅糙颈蠡 <i>Ruidocollaris obscura</i>	KT345952	16 424

续表 1 (Table 1 continued)

亚科 Subfamily	属名 Genus	物种名 Species	GenBank 登录号 GenBank accession no.	线粒体基因组全长 (bp) Complete mitochondrial genome length (bp)
露螽亚科 Phaneropterinae	露螽属 <i>Phaneroptera</i>	瘦露螽 <i>Phaneroptera gracilis</i>	KY316379	18 255
		黑角露螽 <i>Phaneroptera nigroantennata</i>	KY316380	16 832
		镰状绿露螽 <i>Phaneroptera falcata</i>	KY458227	15 672
	桑螽属 <i>Kuwayamaea</i>	短翅桑螽 <i>Kuwayamaea brachyptera</i>	KT345950	16 237
		中华桑螽 <i>Kuwayamaea chinensis</i>	KX057735	15 875
	<i>Poecilimon</i>	<i>Poecilimon luschani</i>	MK757458	15 568
		<i>Poecilimon cretensis</i>	NC_077642	15 545
	掩耳螽属 <i>Elimaea</i>	陈氏掩耳螽 <i>Elimaea cheni</i>	NC_014289	15 831
		贝氏掩耳螽 <i>Elimaea berezovskii</i>	MT849266	16 232
	条螽属 <i>Ducetia</i>	日本条螽 <i>Ducetia japonica</i>	KY612457	16 281
		<i>Ducetia</i> sp. NS-2016	KX673198	16 522
	绿螽属 <i>Holochlora</i>	傅氏绿螽 <i>Holochlora fruhstorferi</i>	NC_033993	15 899
	斜缘螽 <i>Deflorita</i>	<i>Deflorita</i> sp. ZJZ-2017	KX057719	16 831
	<i>Isophya</i>	<i>Isophya major</i>	NC_042666	15 724
	麻螽属 <i>Tapiena</i>	双带麻螽 <i>Tapiena bivittata</i>	PP209127	16 414
蛭螽亚科 Meconematinae	小蛭螽属 <i>Microconema</i>	棒尾小蛭螽 <i>Microconema clavata</i>	OP851518	15 618
	栖螽属 <i>Xizicus</i>	贺氏东栖螽 <i>Xizicus howardi</i>	KY458226	16 146

使用 Geneious Prime 2022.2.2 软件, 从上述 24 条线粒体基因组序列中分别提取 13 个蛋白质编码基因和 2 个 rRNA 基因。随后, 采用 Muscle 3.8.425 软件对每一个提取出的基因序列分别进行多序列比对。再将所有基因的独立比对结果导入 SequenceMatrix 1.9 软件, 整合成一个完整的联合数据集, 并将此联合数据集输出为 Nexus 格式文件。然后利用 MrBayes 3.2.2 软件基于联合数据集构建贝叶斯系统发育树 (Ronquist and

Huelsenbeck, 2003), 运行 100 万代。最后, 使用 TreeGraph 2.15.0 软件对生成的系统发育树进行可视化美化处理。

2 结果与分析

2.1 双带麻螽线粒体基因组特征

本研究测序并分析了双带麻螽的线粒体基因组, 其序列全长为 16 414 bp (GenBank 登录

号: PP209127), 包含 37 个基因和 1 个 D-Loop 区(即控制区), 37 个基因中蛋白质编码基因 13 个、tRNA 基因 22 个、rRNA 基因 2 个(表 2 和图 1)。双带麻蠹的线粒体基因组展现出紧凑的基因结构, 基因间隔区的长度介于 0-21 bp 之间, 具有昆虫祖先序列典型的基因排序, 在这些基因中, 有 14 个基因由 N 链(Minority strand, N-strand)编码, 而 J 链(Majority strand, J-strand)则编码了其余 23 个基因(表 2)。

2.2 双带麻蠹线粒体基因组蛋白质编码基因

在双带麻蠹线粒体基因组中, 蛋白质编码基因的起始密码子分布如下: *ATP8*、*ND3*、*ND5*

与 *ND6* 基因以 ATT 起始; *COX2*、*COX3*、*ATP6*、*ND4*、*ND4L* 及 *CYTB* 基因以 ATG 起始; *COX1* 与 *ND1* 基因以 TTG 起始; 而 *ND2* 基因则以 ATA 起始。至于终止密码子, 存在 3 种不同的情况: *COX2*、*COX3*、*ND5* 和 *ND4* 基因以单个 T 作为终止密码子; *CYTB* 和 *ND3* 基因以 TAG 作为终止密码子; 剩余基因(*ND2*、*COX1*、*ATP8*、*ATP6*、*ND4L*、*ND1* 和 *ND6*) 均以 TAA 作为终止密码子(表 2)。

2.3 双带麻蠹线粒体基因组碱基组成

在双带麻蠹线粒体基因组的完整序列中, 总碱基对数为 16 414, 其中 A、C、G 和 T 的含量

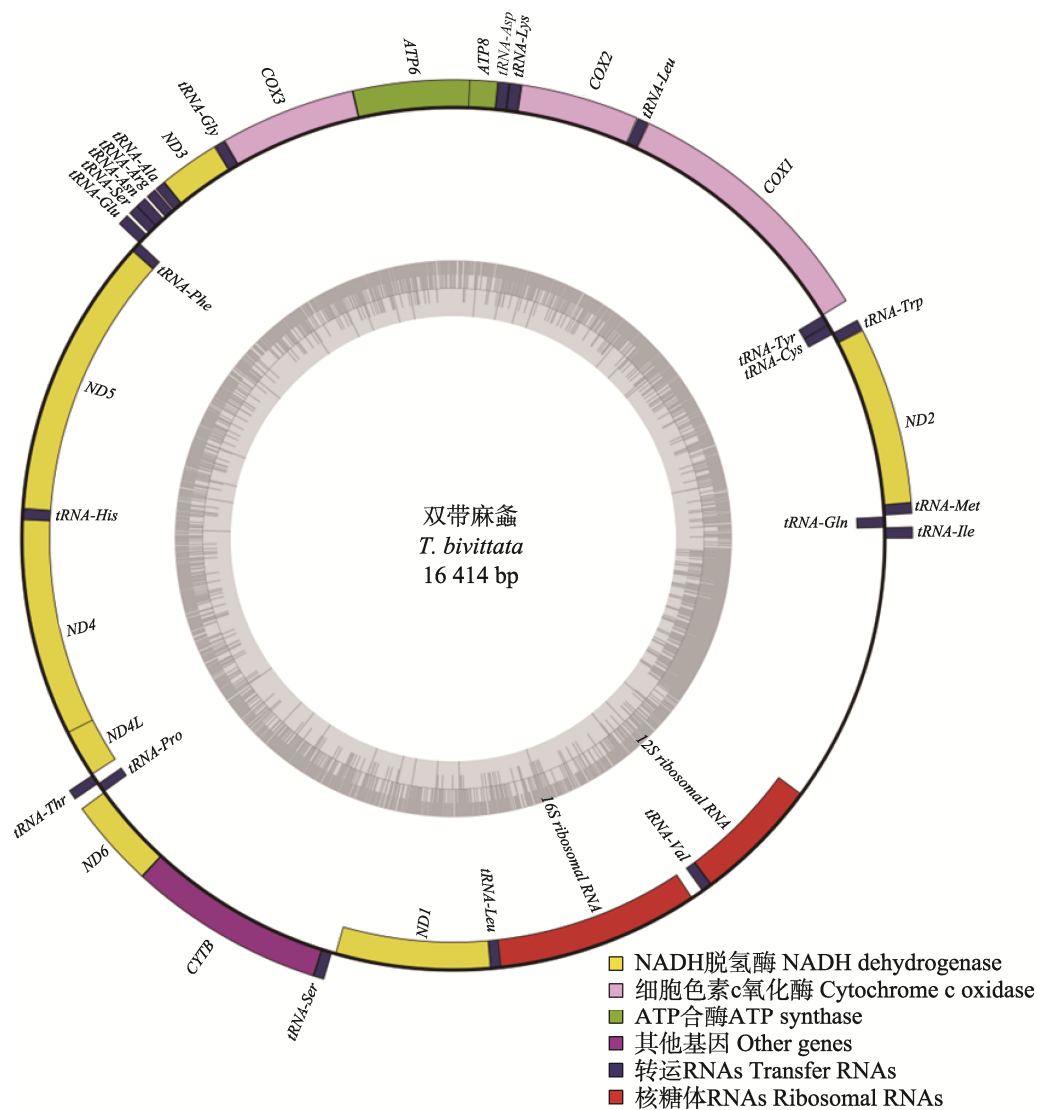


图 1 双带麻蠹线粒体基因组结构图
Fig. 1 The map of Tapiena bivittata mitogenome

表 2 双带麻蚕线粒体基因组组成
Table 2 Organization of *Tapiena bivittata* mitogenome

基因/区域 Gene/region	起始位置 Start position	终止位置 End position	长度 (bp) Length (bp)	间隔 (bp) Intergenic length (bp)	编码链 Coding strand	起始密码子 Start condon	终止密码子 End condon
<i>tRNA^{Ile}</i>	1	69	69		J		
<i>tRNA^{Gln}</i>	67	134	68	- 3	N		
<i>tRNA^{Met}</i>	142	206	65	7	J		
<i>ND2</i>	204	1 232	1 029	- 3	J	ATA	TAA
<i>tRNA^{Trp}</i>	1 234	1 298	65	1	J		
<i>tRNA^{Cys}</i>	1 291	1 353	63	- 8	N		
<i>tRNA^{Tyr}</i>	1 354	1 421	68	0	N		
<i>COX1</i>	1 422	2 957	1 536	0	J	TTG	TAA
<i>tRNA^{Leu (UUR)}</i>	2 959	3 023	65	1	J		
<i>COX2</i>	3 026	3 713	688	2	J	ATG	T
<i>tRNA^{Lys}</i>	3 714	3 783	70	0	J		
<i>tRNA^{Asp}</i>	3 783	3 848	66	- 1	J		
<i>ATP8</i>	3 849	4 013	165	0	J	ATT	TAA
<i>ATP6</i>	4 007	4 681	675	- 7	J	ATG	TAA
<i>COX3</i>	4 681	5 467	787	- 1	J	ATG	T
<i>tRNA^{Gly}</i>	5 468	5 530	63	0	J		
<i>ND3</i>	5 531	5 884	354	0	J	ATT	TAG
<i>tRNA^{Ala}</i>	5 883	5 945	63	- 2	J		
<i>tRNA^{Arg}</i>	5 950	6 012	63	4	J		
<i>tRNA^{Asn}</i>	6 025	6 090	66	12	J		
<i>tRNA^{Ser(AGN)}</i>	6 087	6 149	63	- 4	J		
<i>tRNA^{Glu}</i>	6 165	6 233	69	15	J		
<i>tRNA^{Phe}</i>	6 232	6 293	62	- 2	N		
<i>ND5</i>	6 294	8 025	1 732	0	N	ATT	T
<i>tRNA^{His}</i>	8 026	8 089	64	0	N		
<i>ND4</i>	8 090	9 428	1 339	0	N	ATG	T
<i>ND4L</i>	9 422	9 718	297	- 7	N	ATG	TAA
<i>tRNA^{Thr}</i>	9 722	9 784	63	3	J		
<i>tRNA^{Pro}</i>	9 784	9 846	63	- 1	N		
<i>ND6</i>	9 848	10 366	519	1	J	ATT	TAA
<i>CYTB</i>	10 366	11 502	1 137	- 1	J	ATG	TAG
<i>tRNA^{Ser(UCN)}</i>	11 501	11 565	65	- 2	J		
<i>ND1</i>	11 587	12 537	951	21	N	TTG	TAA
<i>tRNA^{Leu(CUN)}</i>	12 538	12 602	65	0	N		
<i>16S rRNA</i>	12 603	13 915	1 313	0	N		
<i>tRNA^{Val}</i>	13 916	13 983	68	0	N		
<i>12S rRNA</i>	13 983	14 761	779	- 1	N		
D-Loop	14 762	16 414	1 653	0			

分别为 36.0%、19.1%、11.2% 和 33.7%，A+T 含量为 69.7%，G+C 含量则为 30.3%。在 13 个蛋白质编码基因中，碱基组成分析显示 A、C、G 和 T 的含量分别为 29.9%、15.4%、13.6% 和 41.2%，A+T 含量为 71.1%。tRNA 基因碱基总数为 1 436，A、C、G 和 T 的含量为 38.4%、11.8%、13.6% 和 36.2%，A+T 含量达到 74.6%。rRNA 基因序列中共有碱基 2 092，A、C、G 和 T 的含量分别为 35.6%、7.6%、17.9% 和 38.9%，A+T 含量为 74.5%。控制区碱基总数为 1 653，A、C、G 和 T 的相对含量分别为 29.6%、24.0%、26.5% 和 19.9%，A+T 含量占 49.5%（表 3）。

表 3 双带麻蠡线粒体基因组碱基组成
Table 3 Nucleotide composition of *Tapiena bivittata* mitogenome

区域 Region	碱基组成（%）Nucleotide composition (%)					碱基数目（bp） Nucleotide numbers (bp)
	A	C	G	T	A+T	
全线粒体基因组 Complete mitochondrial genome	36.0	19.1	11.2	33.7	69.7	16 414
蛋白编码基因 Protein-coding genes	29.9	15.4	13.6	41.2	71.1	11 209
密码子第 1 位 1st codon position	31.3	14.7	13.0	41.0	72.3	3 737
密码子第 2 位 2nd codon position	27.9	16.5	15.9	39.7	67.6	3 736
密码子第 3 位 3rd codon position	30.4	15.0	11.7	42.9	73.3	3 736
tRNA 基因 tRNA genes	38.4	11.8	13.6	36.2	74.6	1 436
rRNA 基因 rRNA genes	35.6	7.6	17.9	38.9	74.5	2 092
控制区 Control region	29.6	24.0	26.5	19.9	49.5	1 653

2.4 双带麻蠡线粒体基因组密码子使用偏好性与氨基酸组成特征

基于双带麻蠡线粒体基因组的 13 个蛋白质编码基因，采用 MEGA 11.0.13 进行密码子使用分析。结果显示，AUU、UUU、UUA 和 UAU 这 4 个密码子的使用频率最高，分别出现了 265、250、234 和 216 次（图 2：A）。在 RSCU 方面，UUA、GCU、CCU 和 GUU 这 4 个密码子的 RSCU 值最高，分别为 2.6、2.07、1.97 和 1.91（图 2：B）。在氨基酸使用频率方面，亮氨酸（Leu）、丝氨酸（Ser）、苯丙氨酸（Phe）、异亮氨酸（Ile）和酪氨酸（Tyr）的使用频率最高，分别占到了 15.1%、12.07%、9.36%、

8.8% 和 7.93%（图 3）。

2.5 双带麻蠡线粒体基因组 tRNA 基因、rRNA 基因和 D-Loop 区

双带麻蠡线粒体基因组共有 22 个 tRNA 基因，这些基因的长度范围从 62 到 70 bp，具体位置详见表 2。基于 MITOS 2 的 tRNA 二级结构预测分析表明：22 个 tRNA 基因中，tRNA^{Ser(AGN)} 未形成典型三叶草结构，其余 21 个 tRNA 均具有完整的三叶草结构。rRNA 基因共有 2 个，16S rRNA（1 313 bp）位于 tRNA^{Leu} 与 tRNA^{Val} 之间，12S rRNA（779 bp）位于 tRNA^{Val} 与 D-Loop 区之间。D-Loop 区（1 653 bp）位于 12S rRNA 和 tRNA^{Ile} 之间（表 2）。

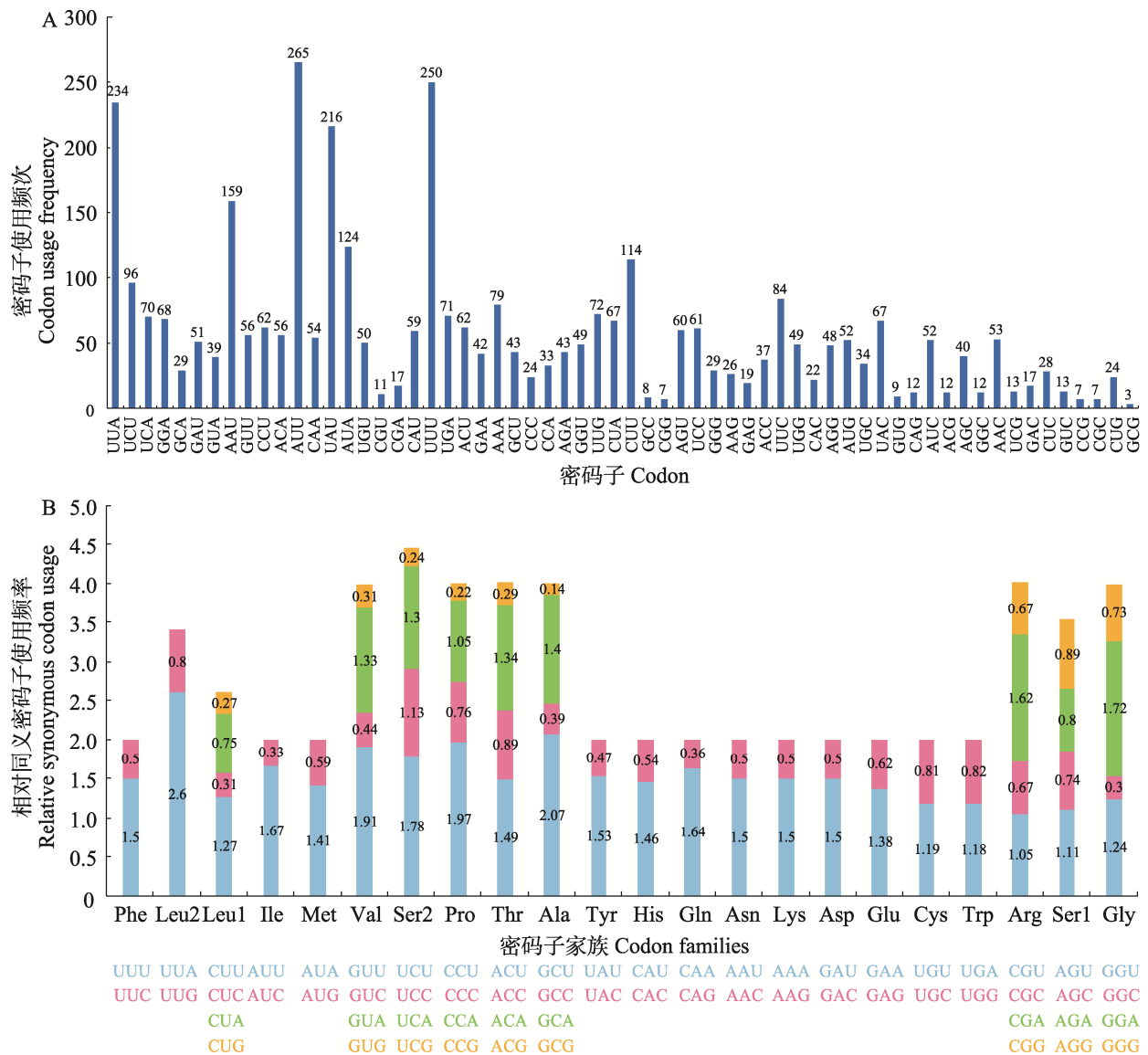


图 2 双带麻蜂线粒体基因组蛋白质编码基因的密码子使用

Fig. 2 Codon usage in protein-coding genes of *Tapiena bivittata* mitogenome

A. 密码子使用频次; B. 相对同义密码子使用度。

A. Codon usage frequency; B. Relative synonymous codon usage.

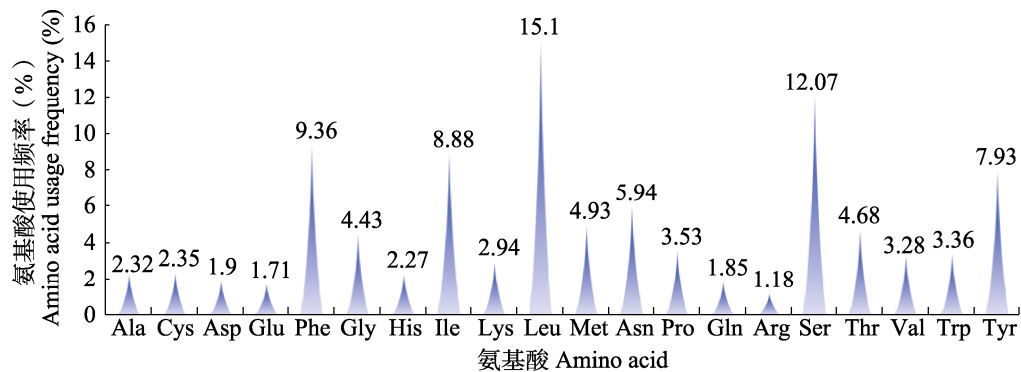


图 3 双带麻蜂线粒体基因组氨基酸组成百分比

Fig. 3 Amino acid composition in protein coding genes of *Tapiena bivittata* mitogenome

2.6 露蠹亚科系统发育树

本研究选取包括双带麻蠹在内的 22 种露蠹亚科物种的线粒体基因组序列, 并选用贺氏东栖蠹 *Xizicus howardi* 和棒尾小蚤蠹作为外群。从这 24 条线粒体基因组序列中, 提取了 13 个蛋白质编码基因和 2 个 rRNA 基因, 进而构建了贝叶斯系统发育树。分析结果揭示露蠹亚科分为两大分支, 其中糙颈蠹属 *Ruidocollaris* 的 3 个物种: 凸翅糙颈蠹 *Ruidocollaris convexipennis*、污翅糙颈蠹 *R. obscura* 和中华糙颈蠹 *Ruidocollaris sinensis* 聚为一支, 显示糙颈蠹属 *Ruidocollaris* 为单系群, 本研究所测的双带麻蠹 *T. bivittata* 与糙颈蠹属 *Ruidocollaris* 聚为一支, 与该属亲缘关系最近; 华绿蠹属 *Sinochlora* 的 4 个物种: 四川华绿蠹 *Sinochlora szechwanensis*、中华华绿蠹 *Sinochlora sinensis*、侧反华绿蠹 *Sinochlora retrolateralis* 和长裂华绿蠹 *Sinochlora longifissa*

也构成一个单系群, 并与傅氏绿蠹 *Holochlorafruhstorferi* 聚为一支; 以上 9 个物种形成第一个聚类簇。桑蠹属 *Kuwayamaea* 的短翅桑蠹 *Kuwayamaea brachyptera* 和中华桑蠹 *Kuwayamaea chinensis* 聚为一支, 然后和日本条蠹 *Ducetia japonica* 聚为一支, 之后和掩耳蠹属 *Elimaea* 的 2 个物种贝氏掩耳蠹 *Elimaea berezovskii* 和陈氏掩耳蠹 *Elimaea cheni* 聚为一支, 最后和 *Deflorita* sp. ZJZ-2017 聚为一簇; 露蠹属 *Phaneroptera* 的瘦露蠹 *Phaneroptera gracilis* 先和条蠹属 *Ducetia* 的 *Ducetia* sp. NS-2016 聚为一支, 然后和露蠹属的其他 2 个物种镰状绿露蠹 *Phaneroptera falcata*、黑角露蠹 *Phaneroptera nigroantennata* 聚为一簇; *Poecilimon cretensis* 和 *Poecilimon luschani* 聚为一支, 随后与 *Isophya major* 聚为一簇; 以上 13 个物种形成第二个聚类簇 (图 4)。

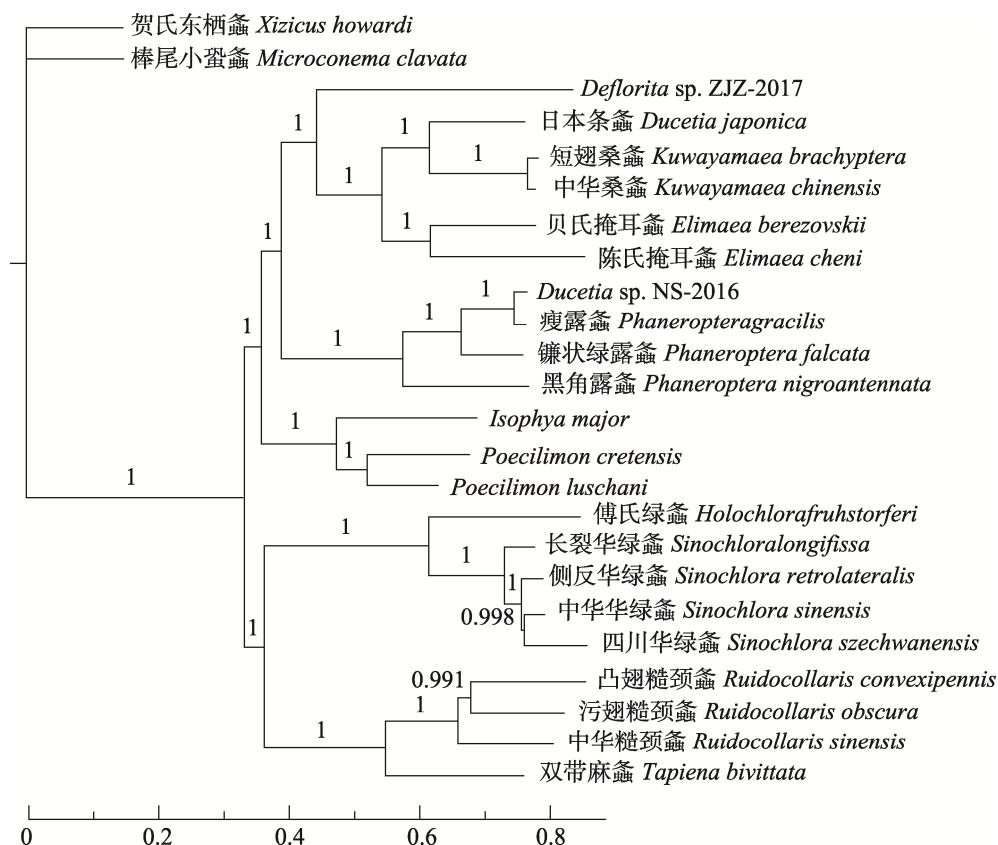


图 4 露蠹亚科系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree in Phaneropterinae

数字表示置信度。The numbers represent the confidence level.

3 讨论

本研究基于高通量测序技术获取双带麻螽基因组数据,并通过 Mira 4.0.2 与 MITObim 1.9.1 成功解析其完整线粒体基因组序列。随后,利用 Geneious Prime 2022.2.2 进行基因注释,结合 MEGA 11.0.13 分析碱基组成及密码子使用偏好,并借助 MITOS 2 预测了 tRNA 的二级结构。双带麻螽线粒体基因组序列总长度为 16 414 bp,含 37 个基因,包括 13 个蛋白质编码基因、22 个 tRNA 基因、2 个 rRNA 基因及 1 个 D-Loop 控制区,基因排列与昆虫祖先一致。

双带麻螽线粒体基因组的碱基组成分析表明,其 AT 总占比达 69.7%,GC 含量为 30.3%,表现出明显的 AT 偏向,这一特性与直翅目昆虫的线粒体基因组特征相符,直翅目物种线粒体基因组的平均 AT 含量为 73.6%,且碱基丰度通常呈现 A>T>C>G 的排列模式(王帅宇, 2005; 常会会, 2022),这可能与其在进化过程中对环境的适应有关,AT 含量的增加可能有助于提高基因的转录效率和蛋白质的合成速率,从而增强物种的生存能力(Boore, 1999; Cameron, 2014)。在蛋白质编码基因的起始密码子方面,COX1 和 ND1 基因的起始密码子为 TTG,而其他蛋白质编码基因则采用 ATN 作为起始密码子;终止密码子的使用也存在差异:COX2、COX3、ND5 和 ND4 基因以单碱基 T 作为终止信号,其余基因则通过 TAA 或 TAG 实现终止。这一规律与螽亚目线粒体基因组的普遍特征一致,即起始密码子以 ATN 为主(偶见 TTG 或 GTG),终止密码子类型包括 TAA、TAG、TA 及 T(刘菲, 2017)。此外,双带麻螽线粒体基因组中,亮氨酸(Leu)的使用频率最高,RSCU 最高的密码子为 UUA,这一现象与螽斯科其他物种的表现相似(刘菲, 2016, 2017; 邱忠营, 2016; Mao *et al.*, 2018)。亮氨酸的高使用频率和 UUA 密码子的高 RSCU 值可能反映了双带麻螽在蛋白质合成过程中对特定氨基酸的偏好,这可能与其生理功能有关(常会会, 2022)。

本研究以贺氏东栖螽和棒尾小蛱螽为外群,

选取包括双带麻螽在内的 22 种露螽亚科物种的线粒体基因组序列,基于 13 个蛋白编码基因和 2 个 rRNA 基因数据集构建了露螽亚科的系统发育树。结果显示,糙颈螽属、华绿螽属、掩耳螽属、桑螽属和 *Poecilimon* 均为单系群,而露螽属为非单系群,Liu 和 Li (2020) 的研究也表明露螽属为非单系群。本研究中测序的双带麻螽与糙颈螽属的 3 个物种聚为一支,表明其与糙颈螽属的亲缘关系最近。

本研究首次获得并分析了双带麻螽的完整线粒体基因组序列,揭示了基本特征、碱基组成、密码子和氨基酸的使用情况等,并基于线粒体数据构建了露螽亚科的贝叶斯系统进化树,对露螽亚科的系统发育关系进行了初步探究。然而,目前露螽亚科中完成线粒体基因组测序的物种数目相对较少,这使得当前的分析结果还无法充分揭示属间的确切关系。鉴于此,未来的研究应当进一步扩充分类单元,以进一步完善露螽亚科的系统发育框架。

参考文献 (References)

- Battiston R, Fontana P, 2024. Orthoptera in the far side of the world: The southernmost new genus of *Phaneropterinae*, and the ecology of some subantarctic Orthoptera. *Bulletin of Insectology*, 77(1): 101–108.
- Boore JL, 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, 27(8): 1767–1780.
- Cameron SL, 2014. Insect mitochondrial genomics: Implications for evolution and phylogeny. *Annual Review of Entomology*, 59: 95–117.
- Chang HH, 2022. Construction and application of the evolutionary model of mitochondrial genomes in Orthoptera insects. Doctor dissertation. Xi'an: Shaanxi Normal University. [常会会, 2022. 直翅目昆虫线粒体基因组进化模型的构建及应用. 博士学位论文. 西安: 陕西师范大学.]
- Chang HH, Yang LP, Liu F, Wang XY, Qiu ZY, Li XJ, Huang Y, 2018. Complete mitochondrial genomes and phylogenetic analysis of *Oxya adentata* and *Pternoscirta caliginosa*. *Genomics and Applied Biology*, 37(1): 210–218. [常会会, 杨丽平, 刘菲, 汪晓阳, 邱忠营, 李雪娟, 黄原, 2018. 无齿稻蝗和黄翅蝗线粒体基因组与系统发育分析. 基因组学与应用生物学, 37(1): 210–218.]
- Greiner S, Lehwark P, Bock R, 2019. OrganellarGenomeDRAW (OGDRAW) version 1.3.1: Expanded toolkit for the graphical visualization of organellar genomes. *Nucleic Acids Research*,

- 47(W1): W59–W64.
- Hahn C, Bachmann L, Chevreux B, 2013. Reconstructing mitochondrial genomes directly from genomic next-generation sequencing reads: A baiting and iterative mapping approach. *Nucleic Acids Research*, 41(13): e129.
- Li N, 2008. The taxonomic study on the Tettigonioidae of Northeast Area (Orthoptera: Ensifera). Doctor dissertation. Changchun: Northeast Normal University. [李娜, 2008. 东北地区螞蚱总科昆虫分类学研究(直翅目: 螞蚱亚目). 博士学位论文. 长春: 东北师范大学.]
- Liu CX, 2005. Systematic studies on the subfamily Phaneropterinae (Orthoptera: Tettigoniidae) from China. Doctor dissertation. Wuhan: Wuhan University. [刘春香, 2005. 中国露螞亚科(直翅目: 螞蚱总科: 螞蚱科)的系统学研究. 博士学位论文. 武汉: 武汉大学.]
- Liu F, 2016. Analysis of complete mitochondrial genome of *Sinochlora szechwanensis* (Orthoptera: Tettigoniidae). *Genomics and Applied Biology*, 35(8): 2007–2014. [刘菲, 2016. 四川华绿螞线粒体基因组序列分析. 基因组学与应用生物学, 35(8): 2007–2014.]
- Liu F, 2017. Determination and analysis of mitochondrial genome sequences of *Ducetia japonica*. *Genomics and Applied Biology*, 36(7): 2821–2825. [刘菲, 2017. 日本条螞线粒体基因组序列的测定与分析. 基因组学与应用生物学, 36(7): 2821–2825.]
- Liu F, 2018. Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of *Metriopectera bonneti* (Orthoptera: Tettigoniidae). *Mitochondrial DNA Part B Resources*, 3(2): 1165–1166.
- Liu F, 2019. Next-generation sequencing yields the complete mitochondrial genome of *Conanalis pieli* (Orthoptera: Tettigoniidae). *Mitochondrial DNA Part B Resources*, 4(1): 116–117.
- Liu F, Li JQ, 2020. The complete mitochondrial genome and phylogenetic analysis of *Phaneroptera falcata* (Orthoptera: Tettigoniidae). *Mitochondrial DNA Part B Resources*, 5(2): 1943–1944.
- Liu F, Qiu ZY, 2016. The complete mitochondrial genome of *Fruhstorferiola huayinensis* (Orthoptera: Catantopidae). *Mitochondrial DNA Part B Resources*, 1(1): 273–274.
- Liu F, Zhan MD, Wang LZ, Shu XX, 2023. Mitochondrial genome characteristics and phylogeny of *Microconema clavata*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 60(5): 1348–1357. [刘菲, 詹明德, 王立志, 束潇潇, 2023. 棒尾小蚤螞线粒体基因组特征及其系统进化研究. 应用昆虫学报, 60(5): 1348–1357.]
- Liu J, 2022. Comparative mitogenomic characterization and phylogenetic analysis of Ensifera based on high-throughput sequencing. Master dissertation. Guilin: Guangxi Normal University. [刘静, 2022. 基于高通量测序技术的螞蚱目线粒体基因组特征比较及系统发育分析. 硕士学位论文. 桂林: 广西师范大学.]
- Liu J, Bian X, 2021. Characteristics of the Orthoptera mitogenome and its application. *Journal of Guangxi Normal University (Natural Science Edition)*, 39(1): 17–28. [刘静, 边迅, 2021. 直翅目昆虫线粒体基因组的特征及应用. 广西师范大学学报(自然科学版), 39(1): 17–28.]
- Ma TT, 2011. The molecular phylogenetic research of *Ruidocollaris* and *Sinochlora*. Master dissertation. Changchun: Jilin Agricultural University. [马婷婷, 2011. 糙颈露螞属和华绿露螞属的分子系统学研究. 硕士学位论文. 长春: 吉林农业大学.]
- Mao SL, Yuan H, Lu C, Zhou YF, Shi FM, Wang YC, 2018. The complete mitochondrial genome of *Xizicus (Haploxizicus) maculatus* revealed by next-generation sequencing and phylogenetic implication (Orthoptera, Meconematinae). *Zookeys*, 2018(773): 57–67.
- Nickle DA, 1984. Revision of the bush katydid genus *Montezumina* (Orthoptera: Tettigoniidae; Phaneropterinae). *Transactions of the American Entomological Society*, 110(4): 553–622.
- Qiu ZY, 2016. Mitochondrial genome comparison, lineage and evolution of Orthoptera insects. Doctor dissertation. Xi'an: Shaanxi Normal University. [邱忠营, 2016. 直翅目昆虫线粒体基因组比较、谱系及进化研究. 博士学位论文. 西安: 陕西师范大学.]
- Qiu ZY, Huang Y, Ru NY, Cui YY, 2020. Sequencing and phylogenetic analysis of mitochondrial genome sequences of *Tagasta indica*. *Guangxi Forestry Science*, 49(4): 471–479. [邱忠营, 黄原, 茹凝玉, 崔媛媛, 2020. 印度橄蝗线粒体基因组测定及系统发育分析. 广西林业科学, 49(4): 471–479.]
- Ronquist F, Huelsenbeck JP, 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12): 1572–1574.
- Shi FM, Yuan JF, 2001. A description of the male of *Tapiena bivittata* Xia et Liu (Orthoptera: Tettigonioidae). *Acta Zootaxonomica Sinica*, 26(2): 240. [石福明, 袁井峰, 2001. 双带麻螞雄性描述(直翅目: 螞蚱总科). 动物分类学报, 26(2): 240.]
- Spooner JD, 1986. A redescription of the angular-winged katydid, *Microcentrum louisianum* Hebard (Orthoptera, Phaneropterinae). *Transactions of the American Entomological Society*, 112(1): 81–84.
- Spooner JD, 1988. *Microcentrum latifrons*, a new species of angular-winged katydid from southwestern United States (Orthoptera, Tettigoniidae, Phaneropterinae). *Transactions of the American Entomological Society*, 114(3/4): 311–317.
- Wang SY, 2005. Molecular evolution and phylogenetic analysis of some species of Phaneropteridae in China based on partial sequence of mitochondrial *Cyt b* gene (Orthoptera: Tettigonioidae). Master dissertation. Chongqing: Southwest University. [王帅宇, 2005. 中国露螞科部分种类线粒体 *Cyt b* 基因分子进化与系统学研究. 硕士学位论文. 重庆: 西南农业大学.]
- Zhao L, Li XJ, Huang Y, 2018. Characterization of the mitochondrial genomics and phylogeny of Orthoptera (Insecta: Arthropoda). *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 30(1): 113–123. [赵乐, 李雪娟, 黄原, 2018. 直翅目昆虫线粒体基因组特征及系统发育研究. 生命科学, 30(1): 113–123.]