

# 基于线粒体 16S rRNA 基因亚洲小车蝗 7 个地理种群的遗传变异分析

高书晶<sup>1</sup> 李东伟<sup>2</sup> 刘爱萍<sup>1</sup> 闫志坚<sup>1</sup> 王 宁<sup>1</sup> 魏云山<sup>3</sup>

(1. 中国农业科学院 草原研究所, 内蒙古 呼和浩特 010010; 2. 内蒙古农业大学 农学院, 内蒙古 呼和浩特 010019; 3. 赤峰市农牧科学研究所, 内蒙古 赤峰 024031)

**摘要:** 为了解内蒙古草原优势害虫亚洲小车蝗(*Oedaleus asiaticus*) 的种群状况, 采用线粒体 DNA(mtDNA) 16S rRNA 基因测序技术对 7 个不同地理种群的亚洲小车蝗的种群结构和遗传变异进行研究。通过对亚洲小车蝗 28 个个体的线粒体 16S rRNA 基因进行测序, 获得 1 个长度为 289 bp 的同源序列, 通过编辑, 剪切有 267 bp 的序列基可用于这 28 个个体的比较。在 267 bp 的序列中, A + T 约占 69.9%, A + T 含量明显高于 G + C 含量。其中有 20 个变异位点, 约占所测核苷酸总数的 7.49%, 密码子第 3 位点上的变异最多。共检测出 18 个单倍型。以斑腿蝗科的鼓翅皱膝蝗 *Angaracris barabensis* 和槌角蝗科的宽须蚁蝗 *Myrmeleotettix palpalis* 作外群构建 NJ 和 UPGMA 分子系统树。聚类结果表明, 亚洲小车蝗 mtDNA 16S rRNA 基因序列不同个体间存在一定的分歧, 呈现平行分布, 没有明显的地理分布簇群, 遗传变异与地理距离无明显相关性。

**关键词:** 亚洲小车蝗; 地理种群; mtDNA; 16S rRNA 基因; 遗传变异

中图分类号: S433.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2012)04-0054-06

## Genetic Variation Analysis of Seven Geographic Populations of *Oedaleus asiaticus* B. Bienko from Inner Mongolia based on Mitochondrial 16S rRNA Gene Sequences

GAO Shu-jing<sup>1</sup> LI Dong-wei<sup>2</sup> LIU Ai-ping<sup>1</sup> YAN Zhi-jian<sup>1</sup> WANG Ning<sup>1</sup> WEI Yun-shan<sup>3</sup>

(1. Grassland Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Huhhot 010010, China; 2. Inner Mongolia Agriculture University, Institute of Agriculture, Huhhot 010019, China; 3. Chifeng Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Chifeng 024031, China)

**Abstract:** In order to understand the population status of *Oedaleus asiaticus*, one of the most dominant grasshoppers in inner Mongolia, we investigated the genetic structure and genetic variation of seven populations of *O. asiaticus* using mtDNA sequence of 16S rRNA. Partial sequence of 289 bp was obtained through sequencing 16S rRNA gene of 28 individuals from seven geographical populations and 267 bp can be used to analysis through editing and cutting. In the sequences obtained, A + T% was about 69.9% and A + T% was significantly higher than G + C%. Twenty polymorphic sites were detected in the 267 bp nucleotide, accounting for 7.49%, and the most of variation are on the third position of the codon. 18 hapotypes were detected in 28 individuals. The molecular phylogenetic tree was constructed with NJ and UPGMA method using *Angaracris barabensis* and *Myrmeleotettix palpalis* outgroup species. The phylogenetic trees suggested that different individuals of *O. asiaticus* from seven geographical populations were located in different clusters, the branches of clusters are parallel and there is no obvious clusters of geographical populations. There is no significant correlation between genetic variation and geographic distance.

**Key words:** *Oedaleus asiaticus*; Geographical populations; mtDNA; 16S rRNA; Genetic variation

亚洲小车蝗(*Oedaleus asiaticus* B. Bienko) 是我国北方草原的优势种蝗虫之一, 主要分布于内蒙古、

收稿日期: 2012-03-04

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(1610332012208)

作者简介: 高书晶(1978-), 女, 内蒙古包头人, 副研究员, 博士, 主要从事有害生物综合治理研究。

河北、甘肃和青海省等地区,以禾本科植物为食,也是我国农牧交错地带的重要害虫<sup>[1-3]</sup>。近年来,由于气候变化及人类对草原生态环境的破坏,蝗灾暴发频繁,而且该蝗飞行能力很强,在各地起飞严重,聚集迁移,已经成为蝗灾北移的主力军<sup>[4-6]</sup>,不仅危害草原,而且大量集群式在城市中心出现,给人们的生活造成了极大的困扰<sup>[7-9]</sup>。对亚洲小车蝗种群结构和遗传变异的研究是综合防治中的重要一环。了解种群的遗传变异信息有助于准确地判断草原蝗虫的生态适应性,并为制定出科学合理的防治措施提供理论指导。

线粒体 DNA( mtDNA) 具有分子量小、进化速度快、结构简单、表现为母系遗传等特点,近年来被广泛用于动物群体遗传学和系统进化的研究<sup>[10-13]</sup>。国内外有关动物线粒体 DNA 研究的报道很多,发展比较迅速<sup>[14]</sup>。在线粒体 DNA 中,16S rRNA 基因是研究得比较多的基因,为生物所共有,功能相同,既具有保守序列,又具有可变序列,可以很方便地用通用引物或保守引物进行 PCR 扩增,所以该基因的序列已在许多类群中被测定,并在分子遗传学研究中

被广泛应用<sup>[15-17]</sup>。目前,对亚洲小车蝗遗传多样性的研究还很少,邵丽华等<sup>[18]</sup>利用 RAPD 技术对内蒙古中东部地区 3 个地理种群的遗传多样性进行了分析;高书晶等<sup>[19-20]</sup>利用等位酶及 RAPD 技术对内蒙古地区 9 个地理种群的遗传多样性进行了研究。利用线粒体 16S rRNA 对亚洲小车蝗进行遗传学研究还未见报道。本试验利用线粒体 16S rRNA 测序技术研究了 7 个地理种群亚洲小车蝗的遗传学关系,为揭示不同地理种群间的内在联系提供分子生物学方面的证据。同时,为了解各地区亚洲小车蝗种群在数量和空间上的内在联系、生态适应性及制定合理的防治策略提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 供试虫源

供试亚洲小车蝗主要采自内蒙古地区的 7 个盟市,采集地点及其地理位置见表 1。供试虫源在蝗虫自然种群中随机取样,样品采集后活体带回实验室,将每头蝗虫分别装于不同塑料管中进行标记,保存于 -70℃ 冰箱中备用。

表 1 用于线粒体 DNA 分析的亚洲小车蝗标本  
Tab.1 Specimens of *O. asiaticus* for mtDNA analysed

种群名称 Group	采集地点 Sites	代码 Code	个体数 Number	采集时间(年-月) Collection date( year-month)	地理位置 Location
乌兰察布市	四子王旗	X	4	2009-08	E: 111°21′ N: 41°22′
包头市	达茂旗	D	4	2009-08	E: 109°16′ N: 41°21′
阿拉善盟	阿拉善左旗	A	4	2009-08	E: 103°10′ N: 40°47′
赤峰市	阿鲁科尔沁旗	C	4	2009-08	E: 117°58′ N: 42°26′
通辽市	扎鲁特旗	T	4	2009-08	E: 121°14′ N: 43°59′
呼伦贝尔市	新巴尔虎左旗	H	4	2009-08	E: 120°31′ N: 49°51′
兴安盟	阿尔山	Z	4	2009-08	E: 120°51′ N: 46°11′

1.2 总 DNA 提取

参照张民照等<sup>[21-22]</sup>方法进行改进。取蝗虫成虫的后足,用三蒸水最少冲洗 3 遍,剪碎材料,加入 0.8 ml 4℃ 预冷研磨液(200 mmol/L Tris-Cl, pH 值 8.0; 1% SDS; 100 mmol/L EDTA; 50 μg/mL 蛋白酶 K),于 37℃ 温育 4 h,再加入等量酚和酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),然后收集水相,再加入 NaCl(150 mmol/L)及 2 倍乙醇,置于 -20℃ 冰箱中过夜;离心干燥后,在 DNA 沉淀块中加 0.4 mL TE 缓冲液和

RNA 酶(50 μg/mL),37℃ 温育 5 h 后,加入蛋白酶 K 120 μg,继续温育 5 h,用上述方法重复抽提 DNA 1 次,然后用 100 μL TE 溶解 DNA,4℃ 下贮存使用。

1.3 16S rRNA 基因片段扩增及序列测定

本试验用于扩增亚洲小车蝗线粒体 DNA 16S rRNA 基因的引物为昆虫通用引物,其设计参考文献[23]。引物由上海生工生物工程有限公司合成。引物序列见表 2。PCR 扩增的目的片段为 mtDNA 16S rRNA 基因编码区中的长度 289 bp 一段序列。

表 2 亚洲小车蝗线粒体 DNA 16S rRNA 基因片段 PCR 扩增和测序的引物

Tab.2 Primers used for PCR and sequencing of mtDNA 16S rRNA of *O. asiaticus*

引物 Primers	序列 Sequences	碱基数 Nucleotide number	Tm/℃
LR-N-13176	5'-ACGAGAAGACCCTATGGAGC-3'	20	59.9
LR-J-42887	5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'	22	62.1

PCR 扩增反应体系包括: 30 ~ 60 ng 模板 DNA, 5.0 μL 10 × 缓冲液, 3.0 μL (25 mmol/L) Mg<sup>2+</sup>, 2.0

$\mu\text{L}$  (2.5 mmol/L) dNTPs, 上下游引物各 2.0  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{mol/L}$ ), 1.5 U *Taq* DNA 聚合酶。反应在 0.2 mL PCR 管中进行, 反应总体积为 50  $\mu\text{L}$ , 反应混合物用 20  $\mu\text{L}$  石蜡油覆盖防蒸发。反应均设置阴性对照 (不含 DNA 模板), 以防外源 DNA 污染造成结果误差。

PCR 步骤为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 1 min, 58℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1.5 min, 37 个循环; 72℃ 延伸 7 min, 4℃ 保存。PCR 粗产物的纯化及测序由上海生工生物有限公司完成。进行采用 ABI100-377 型全自动序列分析仪。

#### 1.4 DNA 序列数据的处理

得到的 DNA 序列用 Dnastar 8.0 软件处理, 用 Dnastar Package 中的 Edit seq 软件进行编辑、剪切, 经过核对校正后的序列用 Megalign (Clustal W) 软件进行排序、比较和保存。用 Dnasp 3.0 软件统计序列的单倍型, 序列相同的属于同一单倍型。用 Mega 4.1 软件计算核苷酸使用频率, 基于 Kimura-2-Parameter 双参数模型, 用 NJ 和 UPGMA 法构建系统进化树。

## 2 结果与分析

### 2.1 亚洲小车蝗 16S rRNA 基因检测结果

PCR 扩增结果见图 1, 凝胶电泳检测显示在 289 bp 左右有一清晰的条带, 无其他干扰条带。对测得

的亚洲小车蝗 28 个个体 16S rRNA 基因序列做相似性比较, 相似性为 97.48%, 与 GenBank 上已发表的亚洲小车蝗 16S rRNA 基因序列比对同源性最高达 99% (AY952309)。说明扩增的是目的片断而不是其他同源基因。

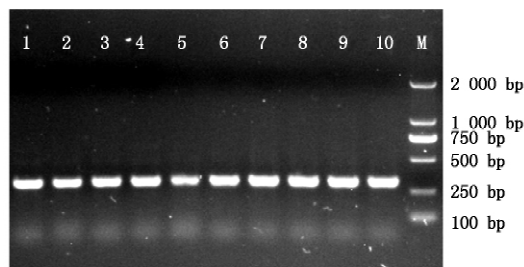


图 1 16S rRNA 基因部分序列电泳

Fig.1 Electrophoresis of 16S rRNA gene

### 2.2 16S rRNA 基因序列及其多态性

7 个不同地理种群亚洲小车蝗 16S rRNA 基因序列比较见图 2, 对得到的 289 bp 的 mtDNA 16S rRNA 基因序列进行排序, 去掉两端测序误差大的区域, 得到长度为 267 bp 的片段可用于遗传差异分析。

经 Mega 4.1 软件分析, 得到的 267 bp 序列中的 A、T、C、G 碱基含量分别为 28.2%, 42.1%, 10.3%, 19.4%。A + T 平均含量为 69.9%, 而 G + C 含量只有 30.1%, A + T 含量明显高于 G + C 含量。用 dnasp3.0 软件统计核苷酸的变异位点, 检测出 20 个变异位点, 约占所测核苷酸总数的 7.49%,

```
111111111122222222223333333333444444444455555555556666666666777777777788888888889
12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
A-2 GATGATTTCCTTAATATTAATTGTTTGGTTGGGTGACTTGAAGAATAAACTCTTCATTATTAATCATTGATTATGTTT
A-3 .....
A-4 .....
A-5 .....
C-1 .....
C-2 ..A.....G.....C.....
C-3 .....
C-4 .....
D-2 .....T.....T.....
D-3 .....
D-4 .....C.....
D-5 .....
H-1 .....
H-2 ..A.....A.....
H-3 .....
H-4 .....
T-1 .....C.....
T-2 ..A.....G.....
T-3 .....
T-4 .....
X-1 .....
X-2 .....
X-3 .....A.....
X-4 .....
Z-1 .....
Z-2 .....
Z-3 .....
Z-4 .....
HJ-2 .T.A...T...G.....G.....T.....T.....A.....
K-2 ...AG.C.T..T...TGA.G..GG...T.....A.....A.....T...A.....A.....
G-2 ...T..C.T.CT..G.A.T...T.AC.A.....A.....T.....C
```

图2 亚洲小车蝗 28 个个体及 2 个外群种 mtDNA 16S rRNA 267 bp 基因序列

**Fig. 2** 267 bp DNA fragments of mitochondrial 16S rRNA gene of twenty-eight *O. asiaticu* and two outgroup species

密码子第 3 位点上的变异最多,占 50.14%,第 2 位点 29.42%,第 1 位点 20.44%。不同个体间碱基替换数最小为 4,最大为 10,其中,转换数要高于颠换数,没有发现碱基的插入或缺失。不同地理种群间亚洲小车蝗的遗传距离最大为 0.026,最小为 0,即序列相同,种群间平均遗传距离为 0.020 1。

### 2.3 系统进化树

以鼓翅皱膝蝗和宽须蚁蝗为外群构建内蒙古 7 个不同地理种群的亚洲小车蝗共 28 个个体和 18 个单倍型的分子系统树,UPGMA 和 NJ 法的聚类结果基本一致(图 3),各分支的置信度用 Boot-strap 1000 循环检验,最低和最高置信度分别为 87 和 100。聚类结果显示 28 个亚洲小车蝗个体总体上聚在 2 个主要族群中,赤峰(C-2)、通辽(T-2)、呼伦贝尔(H-

2)的亚洲小车蝗首先聚成一簇,随后又与其他地区的亚洲小车蝗种群构成聚类簇 I。2 个外群种分别聚成一簇,构成了聚类簇 II 和 III。I 与 II 先聚成一簇,表明鼓翅皱膝蝗与亚洲小车蝗的亲缘关系更近一些。除通辽(T-2)、赤峰(C-2)、呼伦贝尔(H-2) 3 个个体表现出与其他个体较大的遗传差异外,种群内的多数个体间差异并不明显,呈现一种平行式的分布。同一地理种群间的个体相聚几率较大,同时,不同地理种群间的个体也可以较高的置信度相聚。聚类结果与种群地理距离间没有明显的相关性,亚洲小车蝗不同地理种群的个体之间呈现一种平行式的分布关系。2 个外群种与亚洲小车蝗间的遗传差异较大。

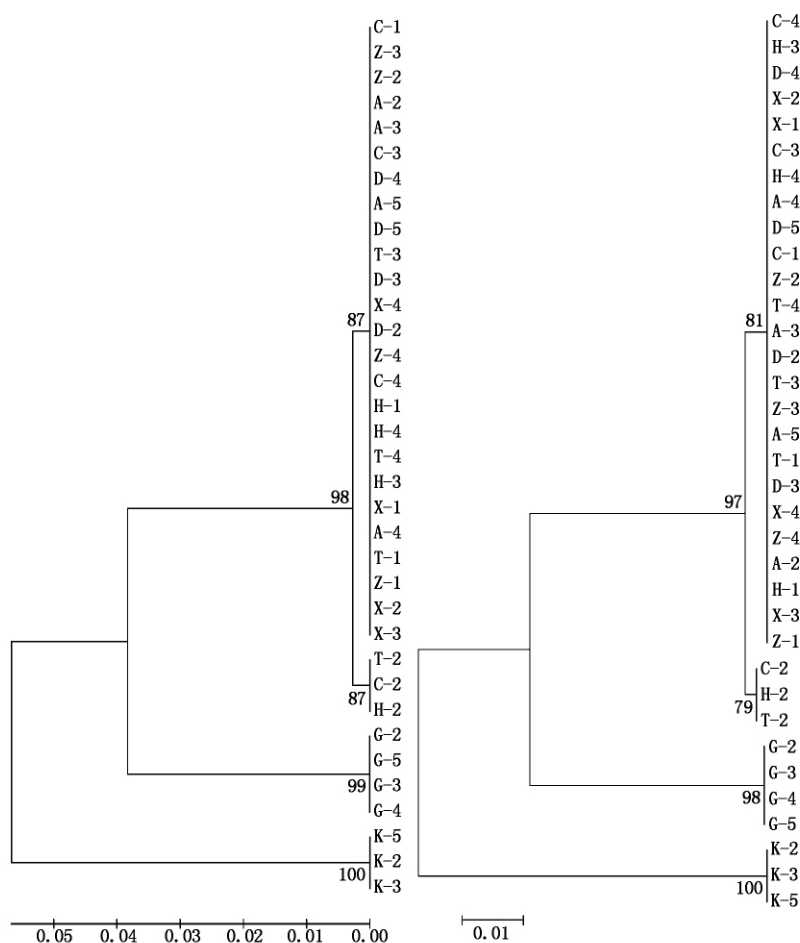


图 3 28 个亚洲小车蝗及 2 个外群种 16S rRNA 基因序列 UPGMA 和 NJ 分子系统树

Fig. 3 UPGMA and NJ tree of mitochondrial 16S rRNA gene of twenty-eight *O. asiaticu* and two outgroup species

### 3 讨论

昆虫线粒体 DNA 能够全面地反映种群间和种群内的遗传差异<sup>[24]</sup>,如果地理种群间存在天然或者人为的隔离屏障造成它们间基因交流的大幅度降低,mtDNA 结构的地理变异可在短期内发生<sup>[25]</sup>。

mtDNA16S rRNA 基因主要由 1 500 个核苷酸组成,其进化速率要比细胞核 DNA 编码的核糖体 RNA 快<sup>[26]</sup>。16S rRNA 基因一直以来备受研究者青睐的原因有几点:一是所有昆虫体内都有该基因存在;二是该基因具有高度的特异性和保守性;三是它具有足够长的基因序列,大约包含 50 个左右的功能域。

因此, 16S rRNA 基因在许多领域被广泛用于研究昆虫系统发育关系和群体遗传差异<sup>[27-28]</sup>。

对亚洲小车蝗的线粒体 16S rRNA 部分基因扩增、测序得到 289 bp 的序列, 序列的 A + T 平均含量为 69.9%, G + C 含量为 30.1%, A + T 含量明显高于 G + C 的含量。这种现象在昆虫中比较普遍<sup>[29-30]</sup>。多数变异发生在密码子的第 3 位点上, 占 50.14%, 与直翅目的斑腿蝗科<sup>[28]</sup>、蝗总科部分种类<sup>[31]</sup>的研究结果一致。转换数明显高于颠换数, 没有碱基的插入或缺失变异。这些结果说明, 不同地理群体间 DNA 序列较多发生同义突变, 密码子第 3 位点表现出极高的替换频率, 该位点所发生的碱基替换大多属于同义替换, 很少引起氨基酸的改变。

分子系统树表明, 各地亚洲小车蝗种群基本聚成一簇, 说明各地理种群间差异很小, 有一定程度的分化, 但分化程度较低。发生变异的位点主要集中在 T-2、C-2、H-2 上。单倍型在系统树中的分布散乱、混杂, 也没有显示出明显的地理分布簇群, 不同的群体之间在遗传物质上有着较大的保守性, 种群彼此之间的遗传分化程度与其间相隔的地理距离之间并不具有显著的相关性。选取的 2 个外群种中鼓翅皱膝蝗与亚洲小车蝗先聚成一簇, 表明鼓翅皱膝蝗与亚洲小车蝗的亲缘关系更近一些。

本试验研究选取了内蒙古地区 7 个地理种群的亚洲小车蝗, 每个种群仅取了 4 个样品进行分析, 研究个体数有些不足, 为了更全面地反映亚洲小车蝗各地理种群间遗传变异和空间分布规律的内在联系, 还需增加地理种群数量和样品数量及应用其他分子生物学手段进行进一步探讨, 以期对亚洲小车蝗的区域性控制提供全面的科学依据。

#### 参考文献:

- [1] 全国畜牧兽医总站草业饲料处. 内蒙古草原蝗虫形成大暴发之势[J]. 草业科学, 2002, 19(4): 78.
- [2] 许富祯, 孟正平, 郭永华, 等. 乌兰察布市农牧交错区亚洲小车蝗发生与防治[J]. 内蒙农业科技, 2005 (S2): 384-387.
- [3] 潘建梅. 内蒙古草原蝗虫发生原因及防治对策[J]. 中国草地, 2002, 24(6): 66-69.
- [4] 吴效东. 乌兰察布市蝗虫发生规律及危害特点[J]. 内蒙农业科技, 2007(6): 69-70.
- [5] 都瓦拉. 草原蝗灾遥感监测与评估方法研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古师范大学, 2006.
- [6] 张润熙. 察右前旗土蝗发生特点与防治措施探讨[J]. 内蒙农业科技, 2001(S2): 150-151.
- [7] 乔峰. 蝗灾北移的主力军. 亚洲小车蝗[J]. 人与生物圈, 2005(3): 23-25.
- [8] 蒋湘, 买买提明, 张龙. 夜间迁飞的亚洲小车蝗[J]. 草地学报, 2003, 11(1): 75-77.
- [9] 牛虎力, 周强. 草原蝗虫的红外灯光诱集实验初报[C]. 中国植物保护学会第九届会员代表大会暨 2005 年学术年会农业生物灾害预防与控制研究, 2005.
- [10] Wilbur A, Orbach E A, Wakefield J R, et al. Mitochondrial genotype variation in a siberian population of the Japanese scallop, *Patinopecten yessoensis* (Jay) [J]. J Shellfish Res, 1997, 16(2): 541-545.
- [11] Canapa A, Barucca M, Marinelli A, et al. Molecular data from the 16 S rRNA gene for the phylogeny of Pectinidae (Mollusca: Bivalvia) [J]. J Mol Evol, 2000, 50: 93-97.
- [12] 财音青格乐. 基因工程及其产业[J]. 内蒙农业科技, 1999(S1): 26-27, 29.
- [13] 乔卿梅, 程茂高, 原国辉, 等. 东亚飞蝗不同种群遗传多态性的 AFLP 分析[J]. 华北农学报, 2006, 21(6): 100-102.
- [14] 任竹梅, 马恩波, 郭亚平. 不同区域日本稻蝗 *Cyrtb* 基因序列及相互关系[J]. 山西大学学报, 2002, 25(3): 244-248.
- [15] Maehado E G, Dennebouy M, Suarez M O, et al. Mitochondrial 16S rRNA gene of two species of shrimps: sequence variability and secondary structure [J]. Crustaceana, 1993, 65(3): 279-286.
- [16] 周发林, 江世贵, 姜永杰, 等. 中国南海野生斑节对 5 个地理群体线粒体 16S rRNA 基因序列比较分析[J]. 水产学报, 2009, 33(2): 205-214.
- [17] 王泽乐, 刘映红, 刘洪, 等. 重庆市 26 个南亚果实蝇种群 mtDNA 16S rRNA 基因部分序列及其系统进化[J]. 昆虫知识, 2007, 44(4): 556-561.
- [18] 邵丽华, 贾建宇, 王塔娜, 等. 内蒙古中东部地区亚洲小车蝗 3 个种群的遗传多样性分析[J]. 华北农学报, 2011, 26(1): 122-126.
- [19] 高书晶, 刘爱萍, 闫志坚, 等. 亚洲小车蝗不同地理种群遗传多样性的等位酶分析[J]. 生态学杂志, 2010, 29(10): 1967-1972.
- [20] 李东伟, 高书晶, 庞宝平, 等. 内蒙古地区亚洲小车蝗不同地理种群的 RAPD 分析[J]. 昆虫知识, 2010, 47(3): 472-478.
- [21] 张民照, 康乐. 飞蝗总 DNA 的提取及其 RAPD 分析条件的摸索[J]. 动物学研究, 2001, 22(1): 20-26.
- [22] 印红, 刘晓丽, 王彦芳, 等. 一种改进的昆虫基因组 DNA 的提取方法[J]. 河北大学学报: 自然科学版, 2002, 22(1): 80-83.
- [23] Simon C, Frati E, Bechenbach A, et al. Volition, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers [J]. Annals of the Entomological Society of American, 1994, 87: 651-701.
- [24] Avise J C. Molecular markers, natural history and evolution [M]. New York: Chapman & Hall, 1994: 1-9.
- [25] Avise J C, Arnold J, Ball R M, et al. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics [J]. Ann Rev Ecol Syst, 1987, 18: 489-522.
- [26] 黄原. 分子系统学: 原理、方法及应用 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 70-72.
- [27] 王泽乐, 刘映红, 刘洪, 等. 重庆市 26 个南亚果实蝇种群 mtDNA 16 S rRNA 基因部分序列及其系统进化[J]. 昆虫知识, 2007, 44(4): 556-561.
- [28] 刘殿锋, 蒋国芳, 时号, 等. 应用 16S rRNA 序列探讨斑腿蝗科的单系性及其亚科的分类地位[J]. 昆虫学报, 2005, 48(5): 759-769.
- [29] 曾维铭, 蒋国芳, 张大羽, 等. 用 12S rRNA 基因序列研究斑腿蝗科二属六种的进化关系[J]. 昆虫学报, 2004, 47(2): 248-252.
- [30] 寇静. 网翅蝗科部分种类线粒体 16S rRNA 基因的分子进化与系统学研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2006.
- [31] 印红, 张道川, 毕智丽, 等. 蝗总科部分种类 16S rDNA 的分子系统发育关系[J]. 遗传学报, 2003, 30(8): 766-772.