

白背飞虱 18S 核糖体基因克隆及系统发育*

梁梓强, 梁士可, 刘婷婷, 李广宏, 王方海

(中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室//昆虫学研究所, 广东 广州 510275)

摘要: 以白背飞虱 *Sogatella furcifera* 长翅雌虫为材料, 提取其基因组 DNA, 以已知的半翅目昆虫 18S rDNA 全序列和白背飞虱 18S rDNA 部分序列为参考, 通过 PCR 扩增出白背飞虱 18S rDNA 的未知部分序列, 最后通过拼接, 首次得到了白背飞虱 18S rDNA 的全长序列, 长度为 1 891 bp, 碱基组成比例均衡, 分别为: 24.1% A; 23.7% C; 27.7% G; 24.5% T。将此全长序列与分属 6 个目(半翅目、双翅目、膜翅目、直翅目、鞘翅目、等翅目)昆虫的 18S rDNA 序列进行比较, 一共发现有 4 个保守区域, 其中第二个区域发生插入或缺失的情况最少。以 18S rDNA 第二保守区域进行系统发育分析, 发现原同翅目昆虫多数均与半翅目昆虫菜蚜亲缘关系较近, 但原同翅目飞虱科昆虫, 如白背飞虱、褐飞虱则与半翅目昆虫菜蚜的亲缘关系较远, 表明近年来将原同翅目昆虫全部划归为半翅目还有待商榷之处。

关键词: 核糖体; 18S rDNA; 白背飞虱

中图分类号: Q965 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2017) 01-0121-04

Cloning and phylogenetic analysis of 18S rDNA gene from *Sogatella furcifera* (Horvath)

LIANG Ziqiang, LIANG Shike, LIU Tingting, LI Guanghong, WANG Fanghai

(State Key Laboratory for Biocontrol and Institute of Entomology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The long wing female adults of *Sogatella furcifera* were selected to extract their genomic DNA. According to the complete 18S rDNA gene sequence from Hemiptera, the unknown 18S rDNA sequence of *S. furcifera* was amplified by PCR. The complete 18S rDNA gene sequence of *S. furcifera* was obtained for the first time by splicing the unknown and known 18S rDNA sequences, whole sequence length was 1 891 bp. Comparing 18S rDNA sequence from *S. furcifera* and those from other insects, four conserved regions were found and the second region had the least insertion or deletion. Based on the second region, phylogenetic analysis was made and the results showed that most Homoptera insects used in this study had a close relatives with *Eurydema maracandica* (Hemiptera) except Delphacida.

Key words: ribosome; 18S rDNA; *Sogatella furcifera*

白背飞虱 *Sogatella furcifera* (Horvath) 属半翅目 Hemiptera 飞虱科 Delphacidae, 是粮食作物水稻的重要害虫。白背飞虱成虫常会出现长、短两种不同的翅型个体, 长翅型个体与短翅型个体相比有较强的活动能力, 可以进行远距离迁飞扩散, 但是繁

殖能力较弱, 白背飞虱不同翅型个体的比率是预测其种群动态变化的关键指标之一^[1]。

昆虫基因组存在 DNA 甲基化现象^[2], 同时 DNA 的甲基化与昆虫的多型现象密切相关^[3]。白背飞虱中, DNA 甲基化的研究主要围绕其对性别

* 收稿日期: 2016-05-16

基金项目: 广东省自然科学基金 (S2022020002353, 031628); 国家自然科学基金 (311771844)

作者简介: 梁梓强 (1991 年生), 男; 研究方向: 昆虫分子生物学; E-mail: 616661857@qq.com

通信作者: 王方海 (1965 年生), 男; 研究方向: 昆虫生理生化; E-mail: lsswfh@mail.sysu.edu.cn

分化^[4-5]和翅型分化^[6]的作用展开了探索。利用甲基化敏感性代表性差异分析法 (MS - RDA) 分析白背飞虱长、短翅型雌成虫基因组, 发现两个特异的 DNA 甲基化片段分别与 18S 和 28S rDNA 高度同源^[6]。因此获得核糖体基因全长序列将有助于进一步分析其甲基化的具体式样和水平, 找出不同翅型个体间存在的差异, 从而有可能弄明白核糖体 DNA 甲基化对白背飞虱翅型分化的具体作用和机制。

真核生物核糖体是细胞内合成蛋白质的场所, 由大、小两个亚基组成, 主要成分为核糖体 RNA 和蛋白质。核糖体 RNA 具有自我复制和剪切功能。20 世纪 80 年代以来, 伴随着序列分析软件和计算机的发展, 核糖体基因被广泛应用于昆虫的分子系统学研究^[7]。

昆虫分类经典的方法主要以形态学为基础, 相对简单且快捷, 但限制形态学鉴定的因素较多, 如昆虫生活环境、分类经验不足等, 所以只靠形态特征进行分类, 难以保证绝对的准确性。核糖体基因中 18S rDNA 具有序列高度保守性, 并且许多生物的 18S rDNA 已被发表^[8-9], 所以比较适合用于各类生物系统发生等进化关系的研究。

本研究参考了大量半翅目昆虫的 18S rDNA 全序列信息, 克隆和分析了白背飞虱 18S rDNA 全长序列, 为日后研究白背飞虱核糖体基因全序列甲基化水平和翅型分化的关系奠定基础。同时, 我们将白背飞虱和六个目昆虫的 18S rDNA 序列进行比较分析, 并根据 18S rDNA 的同源保守区进行了进化树的描绘, 能为分子系统学研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 供试昆虫

白背飞虱成虫采自广州市华南农业大学水稻试验田。将 0.01 g 长翅雌成虫置于液氮中研磨成粉, 其基因组 DNA 的提取采用 Universal Genomic DNA Extraction Kit (TaKaRa), 具体方法和步骤参照该试剂盒的说明书。

1.2 引物设计

从 GenBank 上搜索已经发表的白背飞虱 18S rDNA 序列 (登录号 JF773150, 1 733 bp; 登录号 JX556779, 1 281 bp; 登陆号 HM017250, 1 200 bp) 和白背飞虱 18S-ITS1 - 5.8S - ITS2 - 28S 核糖体序列 (AB625607, AB625606, AB625605), 拼接成一条长度为 1 856 bp 的 18S rDNA 序列。

根据已经公布的半翅目昆虫的 18S rDNA 全序列 (表 1), 利用 Megalign 软件分析表 1 中的 8 个

序列和上述已拼接好的 18S rDNA 序列, 可以得知拼接的白背飞虱 18S rDNA 不是完整序列, 缺失 5' 端部分。

表 1 半翅目昆虫 18S rDNA 全序列的登录号
Table 1 Complete sequence of the Hemiptera 18S rDNA

Species	GenBank accession No.
<i>Philaenus spumarius</i>	U06480
<i>Spissistilus festinus</i>	U06477
<i>Henestaris oschanini</i>	AY324853
<i>Lygus hesperus</i>	U06476
<i>Pachygrontha antennata</i>	AY324852
<i>Hemiowoodwardia wilsoni</i>	AF131198
<i>Okanagana utahensis</i>	U06478
<i>Hackeriella veitchi</i>	AF004766

为了确定白背飞虱 18S rDNA 的 5' 端序列, 我们分别对柑橘木虱 (GCA_000475195.1) 和褐飞虱 (GCA_000757685.1) 的基因组进行分析, 找到其 18S rDNA 及其上游 1 000 bp 序列, 根据 18S rDNA 和上游序列的保守区域设计了一对引物用于扩增白背飞虱 18S rDNA 缺失的 5' 端序列 (图 1), 引物具体如下:

18S - F: 5'ACGAATCATGAGCTGCTGAC 3'

18S - R: 5'ATGGCTTAATCTTTGAGACAAG 3'

18S - F 和 18S - R 预期扩增的序列大小为 515 bp。

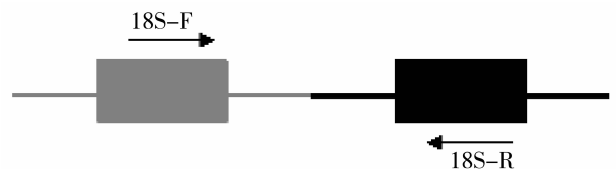


图 1 PCR 扩增白背飞虱 18S rDNA 5' 序列

Fig. 1 PCR strategy to amplify 5' sequence of *S. furcifera* 18S rDNA

灰色部分为白背飞虱 18S rDNA 上游序列; 黑色部分为白背飞虱 18S rDNA 序列; 矩形部分为序列保守区域; 18S - F 和 18S - R 为扩增白背飞虱 18S rDNA 5' 端引物

1.3 PCR 及检测

PCR 的反应体系为: 模板 DNA 2 μ L, 上、下游引物各 4 μ L, Premix Taq (TaKaRa) 25 μ L, ddH₂O 15 μ L。PCR 循环条件为: 94 $^{\circ}$ C 30 s; 94 $^{\circ}$ C 20 s, 51 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 24 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 8 min, 4 $^{\circ}$ C ∞ 。反应结束后, 取 5 μ L PCR 产物进行 $w = 1\%$ 凝胶电泳检测, 然后将目的条带纯化回收, 克隆并测序。

1.4 18S rDNA 序列比对及系统发育分析

从 GenBank 中下载了昆虫纲 6 个目共 9 个 18S rDNA 的序列 (表 2), 结合白背飞虱 18S rDNA 全序列, 利用 DNASTar 和 MEGA5 软件进行分析。

表 2 昆虫 18S rDNA 序列来源

Table 2 The source of insect 18S rDNA sequence

Order	Species	GenBank accession No.
鞘翅目	黄粉虫 <i>Tenebrio molitor</i>	X07801
双翅目	果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	NR133559
膜翅目	蚜茧蜂 <i>Lipolexis scutellaris</i>	AY216699
直翅目	中华稻蝗 <i>Oxya chinensis</i>	AY037173
等翅目	澳白蚁 <i>Mastotermes darwiniensis</i>	AY491152
半翅目	褐飞虱 <i>Nilaparvata lugens</i>	JF773148
半翅目	沫蝉 <i>Philaenus spumarius</i>	U06480
半翅目	褐色橘蚜 <i>Toxoptera citricida</i>	AY216697
半翅目	菜蚜 <i>Eurydema maracandica</i>	JX997807

18S rDNA 序列进行排序处理, 比对发现 4 个具有较高同源性的区域, 分别相当于白背飞虱 18S rDNA 的 1~202, 335~629, 779~1 431 和 1 510~1 760 bp 的序列。4 个同源区域中, 发生插入或缺失的几率低, 主要为转换, 而在非同源区域中, 发生插入或缺失的几率大大增加, 如双翅目或膜翅目昆虫在此区域就存在较多的插入序列。

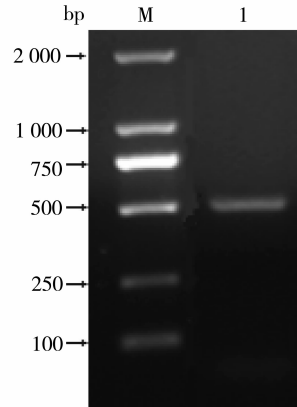


图 2 白背飞虱 18S rDNA 基因 5'端序列扩增结果

Fig. 2 The PCR products of *S. furcifera* 18S rDNA 5' sequence

M: DL-2000 DNA Marker; 1: 扩增产物

2 结果与分析

2.1 白背飞虱 18S rDNA 基因克隆及序列分析

白背飞虱 18S rDNA 5'端序列的 PCR 扩增结果见图 2。将 PCR 产物克隆后进行测序, 测序完成后, 与步骤 1.2 中已拼接出的白背飞虱 18S rDNA 序列进行再次拼接。

根据表 1 中 8 个半翅目昆虫的 18S rDNA 基因序列, 比较分析 18S rDNA 基因的起始位点 (图 3), 最终确定了白背飞虱 18S rDNA 全序列, 共 1 891 bp, 其 GenBank 的登录号为 KU518352。白背飞虱 18S rDNA 全序列碱基组成分别为: 24.1% A; 23.7% C; 27.7% G; 24.5% T, 碱基组成比例均衡。

2.2 昆虫 18S rDNA 同源性及系统发育关系分析

通过使用 DNASTar 中的 MegAlign 程序对 9 个

基于以上的分析, 如果根据 18S rDNA 全序列进行系统发育分析, 结果就会不太可靠。由于在第二个同源区域中, 出现插入或缺失的现象最少, 所以本研究根据第二个同源区域进行系统发育树的构建, 图 4 为所构建的系统进化树。

根据图 4 所示, 我们发现白背飞虱和褐飞虱位于同一分支上, 与双翅目的果蝇亲缘关系最接近, 与鞘翅目的黄粉虫最远。而同属半翅目的沫蝉、褐色橘蚜、菜蚜 3 种昆虫亲缘关系接近, 但与白背飞虱和褐飞虱的亲缘关系较远。

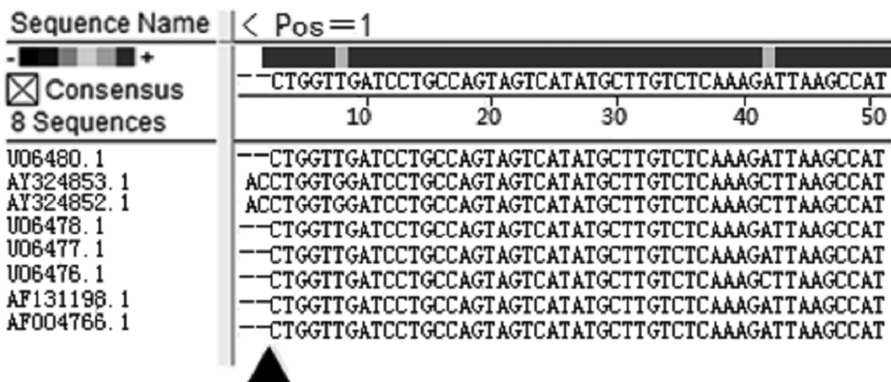


图 3 半翅目 18S rDNA 基因起始位点

Fig. 3 The initiation site of Hemiptera 18S rDNA

黑色箭头指向的核苷酸为半翅目 18S rDNA 基因起始位点

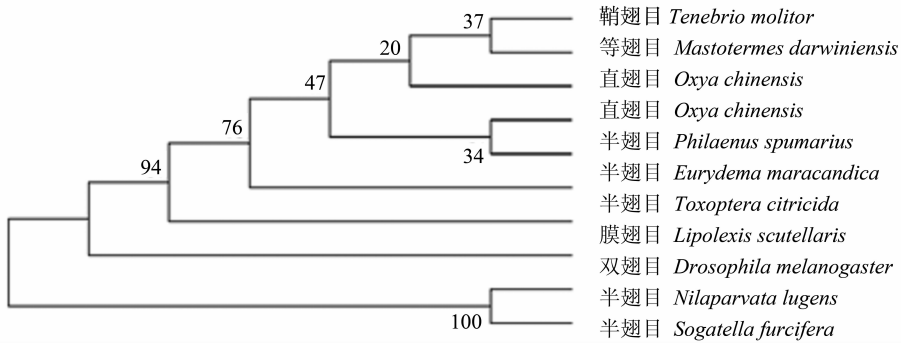


图 4 基于昆虫 18S rDNA 保守区域的系统发生树

Fig. 4 Phylogenetic analysis of the 18S rDNA conserved domain

3 讨论

核糖体基因一直以来都是人们研究的对象, 18S rDNA 基因同样也是白背飞虱研究的热点之一^[6, 10]。过去我们虽然能得到很多有关白背飞虱 18S rDNA 基因的信息, 但是这些基因信息均为部分片段, 使得所做的研究具有局限性。通过对白背飞虱雌雄个体和长、短翅个体的 MSAP 图谱的分析, 发现 DNA 甲基化有可能参与了白背飞虱性别和翅型分化的调控^[11], 其中不同翅型白背飞虱基因组中存在与 18S rDNA 同源的差异 DNA 甲基化片段。本研究首次得到了白背飞虱 18S rDNA 全序列, 为 18S rDNA 基因的甲基化分析提供可靠的序列参考, 并且为今后研究 18S rDNA 基因甲基化式样和水平对白背飞虱性别和翅型分化的调控打下基础。

碱基组合比例对系统发育的构建有较大的影响^[12], 白背飞虱及其它用于构建进化树的昆虫的 18S rDNA 的碱基组合比例均无偏异, 故从 18S rDNA 基因角度可较为真实反映各目昆虫的进化情况。原属同翅目的白背飞虱、褐飞虱、沫蝉、褐色橘蚜与半翅目的菜蚜的亲缘关系各有不同, 沫蝉、褐色橘蚜与菜蚜较接近, 而白背飞虱和褐飞虱与菜蚜则较远。如果从 18S rDNA 基因进化角度来看, 近年来把原同翅目昆虫全部划归为半翅目, 似乎还值得商榷, 因为飞虱科昆虫与半翅目昆虫间亲缘关系并不接近。

参考文献:

[1] 周崇高, 冯娅琳, 陆潮峰, 等. 稻飞虱翅型分化的研究进展 [J]. 湖北农业科学, 2014, 53(17): 3985 - 3990.
ZHOU C G, FENG Y L, LU C F, et al. Advances in Wing Dimorphism of Rice Planthoppers [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2014, 53(17): 3985 - 3990.

[2] DREWELL R A, LO N, OXLEY P R, et al. Kin conflict in insect societies: a new epigenetic perspective [J]. Trends in Ecology and Evolution, 2012, 27(7):

367 - 373.

[3] PATALANO S, HORE T A, REIK W. Shifting behavior: epigenetic reprogramming in eusocial insects [J]. Current Opinion in Cell Biology, 2012, 24: 367 - 373.

[4] ZHANG M, CHEN J L, LIANG S K, et al. Differentially methylated genomic fragments related with sexual dimorphism of rice pests, *Sogatella furcifera* [J]. Insect Science, 2015, 22: 731 - 738.

[5] ZHANG M, CHEN J L, ZHOU X S, et al. Different genomic DNA methylation patterns between male and female adults of white - backed planthoppers *Sogatella furcifera* [J]. Journal of Asia - Pacific Entomology, 2014, 17: 917 - 921.

[6] LIANG S K, LIANG Z Q, ZHOU X S, et al. CpG methylated ribosomal RNA genes in relation to wing polymorphism in the rice pest *Sogatella furcifera* [J]. Journal of Asia - Pacific Entomology, 2015, 18: 471 - 475.

[7] 刘殿锋, 蒋国芳. 核基因序列在昆虫分子系统学上的应用 [J]. 动物分类学报, 2005, 30(17): 484 - 492.
LIU D F, JIANG G F. The application of nuclear genes sequences in insect molecular systematic [J]. Acta Zootaxonomica Sinica, 2005, 30(17): 484 - 492.

[8] NEEB J, van de PEER Y, HENDRICKS L, et al. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(Suppl): 2237 - 2317.

[9] KJER K M. Aligned 18S and insect phylogeny [J]. Syst Biol, 2004, 53(3): 506 - 514.

[10] ZHOU X S, CHEN J L, ZHANG M, et al. Differential DNA Methylation between two wing phenotypes adults of *Sogatella furcifera* [J]. Genesis, 2013, 51(12): 819 - 826.

[11] 张梅, 陈家林, 周晓穗, 等. MSAP 在水稻害虫白背飞虱中的应用研究 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 2015, 54(1): 98 - 102.
ZHANG M, CHEN J L, ZHOU X S, et al. The Application of MSAP in *Sogatella furcifera* (Horvath) [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis SunYatseni, 2015, 54(1): 98 - 102.

[12] LOCKHART P J, HOWE C J, BRYANT D A S, et al. Substitutional bias confounds inference of cyanelle origins from sequence data [J]. J Mol Evol, 1992, 34(2): 153 - 162.