

新疆意大利蝗不同地理种群 16S rDNA 序列差异研究*

程虹¹ 王晗¹ 吴敏^{2**} 季荣^{1**}

(1. 新疆师范大学生命科学学院 乌鲁木齐 830054; 2. 浙江大学生命科学院 杭州 320058)

Calliptamus italicus 16S rDNA in different geographic populations in Xinjiang. CHENG Hong¹, WANG Han¹, WU Min^{2**}, JI Rong^{1**} (1. College of Life Sciences, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, China; 2. College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 320058, China)

Abstract Partial sections of the mitochondrial 16S rDNA of *Calliptamus italicus* (L.) from different geographic populations of Xinjiang Province were compared. The results show that: 1) The percentage of A + T (67.7%) of *C. italicus* was more than G + C (32.3%); 2) Multiple sequence alignment and the UPGMA phylogenetic tree indicate that different geographic populations of *C. italicus* display almost no genetic difference.

Key words *Calliptamus italicus*, 16S rDNA, genetic differentiation, molecule phylogenetic tree

摘 要 研究新疆东部和西部不同地理种群意大利蝗 *Calliptamus italicus* (L.) 线粒体基因中 16S rDNA 序列差异。结果表明:(1) 意大利蝗 A + T 的含量(67.7%)明显高于 G + C 的含量(32.3%);(2) 多重序列比对和 UPGMA 系统发育树的结果表明新疆东、西部不同地理种群的意大利蝗的遗传变异极小。

关键词 意大利蝗, 16S rDNA, 遗传分化, 分子系统树

植食性昆虫寄主植物的选择差异及其机理较为复杂,常因地理种群分化、昆虫发育阶段、生境中优势植物种类、植被长势的不同而不同^[1]。意大利蝗 *Calliptamus italicus* (L.) 是新疆草原优势危害蝗虫种类之一,主要分布于北疆地区,可取食 17 科 45 种植物^[2]。研究发现,不同分布区域意大利蝗对寄主植物的选择存在一定差异,而目前尚不确定造成这种差异的原因是否与意大利蝗不同地理种群的遗传分化有关。本研究以新疆最东部和西部地区的意大利蝗虫种群的 16S rDNA 为研究内容,旨在弄清意大利蝗不同地理种群之间是否存在遗传差异,明确意大利蝗对寄主植物的选择差异是否与不同地理种群间遗传分化有关,并为进一步研究新疆境外迁入危害的意大利蝗种群与新疆境内的意大利蝗虫种群间的遗传差异奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集

意大利蝗于 2008 年 7 月分别采自新疆东部地区的哈密巴里坤白石头乡(42.82°N, 93.49°E, 海拔 2 200~2 400 m)和新疆西部博乐青得里乡(44.56°N, 87.68°E, 海拔 550 m)的荒漠草地。前者植被种类以针茅(*Stipa capillata* L.)、冷蒿(*Artemisia frigida* Willd.)、棘豆(*Oxytropis* sp.)、椒蒿(*Artemisia dracunculus* L.)、鸢尾(*Iris* sp.)等为主,后者主要有紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)、绢蒿(*Seriphidium*

* 资助项目:国家自然科学基金(30660030, 30960230)、新疆师范大学博士科研启动基金(XJNUBS0902)、新疆师范大学重点实验室基金(XJNUSYS0810)。

** 通讯作者, E-mail: jirongxj@yahoo.com.cn; wumin@zju.edu.cn

收稿日期:2009-11-24, 修回日期:2010-05-24

sp.)、骆驼蓬 (*Peganum harmala* L.) 等。

1.2 16S rDNA 基因片段 PCR 扩增和测序

取无水乙醇浸制蝗虫的后足股节,采用通用方法提取基因组 DNA^[3]。参照 Simon 等^[4]发表的文献资料设计 PCR 扩增引物。

PCR 反应体系 50 μL,含 0.3 μL *Taq* 酶 (5U/μL)、0.5 μL dNTP、0.5 μL 引物 LR-J、0.5 μL 引物 LR-N、5 μL 10 × Buffer 溶液 (包含 Mg²⁺) 以及 0.5 μL 模板 DNA 溶液,用 ddH₂O 配至 50 μL 体系。PCR 反应运行 32 个循环,循环前 94 ℃ 预变性 5 min,每个循环包括 94 ℃ 变性 30 s,52 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 45 s,循环完毕再 72 ℃ 延伸 9 min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

扩增效果较好的 PCR 产物样品由北京诺赛基因公司进行测序。

1.3 DNA 序列数据处理和分析

16S rDNA 测序结果使用 Chromas 2.23 查看编辑序列峰值,分别用 Clustal X1.83 和 DNAMAN5.2.2 进行同源序列排列和多序列比对,借助 Mega 4 分析不同地理种群间 16S rDNA 的序列组成,并在 NCBI 网站对所得序列进行最大相似序列比对,采用 Tamura-nei 模型运用非加权组平均法 (UPGMA) 构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 意大利蝗 16S rDNA 基因检测结果

PCR 扩增产生的条带约 500 bp,无其他干扰条带 (图 1)。意大利蝗富含 A 和 T 碱基,A + T 含量明显高于 G + C 含量。意大利蝗 A + T 平均比例为 67.7%,其中 A 碱基所占比例最高,含量范围是 35.8% ~ 36.4%,其次是 T 碱基,为 31.2% ~ 31.9%,C 碱基为 18.0% ~ 18.7%,G 含量最少,为 13.7% ~ 14.3%。16S rDNA 序列测定后提交 GenBank 获得登录号 (表 1)。

2.2 不同地理种群 16S rDNA 差异与系统发育树构建

新疆东部和西部两个意大利蝗种群的

540 bp 序列中,发现变异位点 13 个,简约信息位点 4 个,经分析得出转换/颠换比为 0.4。西部博乐、东部巴里坤种群种内平均遗传距离分别为 0.00363、0.00528,两地理种群间的平均遗传距离为 0.00462。16S rDNA 多重序列比对结果表明,意大利蝗不同地理种群间的序列一致性达到 97.16%。

如图 2 所示,意大利蝗大体出现 2 个簇群。其中,巴里坤 (Balikun) 种群的 H01、H02 样本与博乐种群 (Bole) 4 个样本以 87% 置信度构成一个聚类簇,巴里坤种群 H03 样本以 100% 的置信度单独成为一个聚类簇。

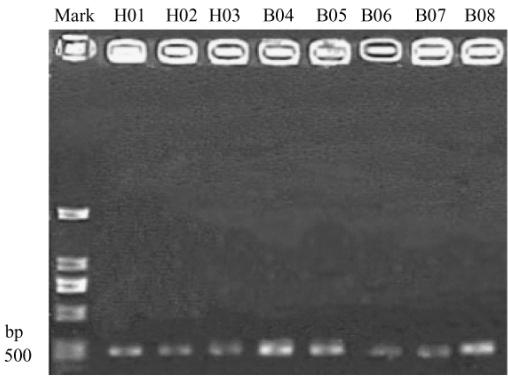


图 1 蝗虫 DNA 样品 PCR 扩增检测结果

表 1 样本序列获得的 16S rDNA GenBank 登录号

种名	编号	GenBank 登录号
意大利蝗	H01	FJ555212
	H02	FJ555213
	H03	FJ555214
	B05	FJ555215
	B06	FJ555216
	B07	FJ555217
	B08	FJ555218

3 结论与讨论

新疆境内东、西部地区的意大利蝗虫不同地理种群的 16S rDNA 存在一定程度的遗传分化,其种内与种间遗传分化均值存在不一致,但遗传距离的数值差异极小,说明其遗传分化程度很低。多重序列比对和 UPGMA 系统发育树结果亦得出相同的结论,即新疆最西部和新疆最东部的意大利蝗种群不存在遗传分化变异。

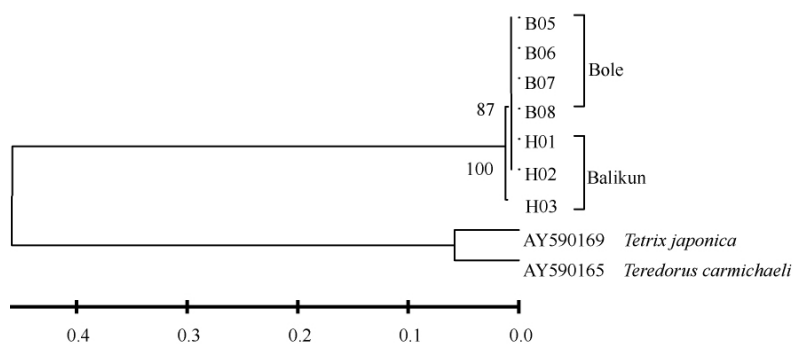


图2 基于16S rDNA序列构建的意大利蝗UPGMA分子系统树

从而说明不同蝗区意大利蝗食性不同不是由于遗传差异所致。理论上,种内适应于不同生态条件的遗传类群在种群遗传分化上应存在一定差异,因为各自所处的生态环境条件会对其种群遗传结构产生影响。如长期在地理位置、海拔差距较大的地域中会逐渐形成基因中的差异性,从而造成同一种群中不同个体分布于不同的生态环境中所形成的种群内丰富的遗传多态性。就本研究而言,博乐和巴里坤分属于新疆最西部和最东部的地区,在地理位置、海拔和气候等都存在较大差异,但两个地区的意大利蝗种群的遗传分化程度很低,这充分说明了蝗虫线粒体16S rDNA的保守性^[5]。

就地理位置而言,伊犁、阿勒泰、塔城和博乐均位于新疆西部的边境区域,但本研究选择了以博乐种群作为新疆西部的典型样区,是因为近年来一直有哈萨克斯坦境内的意大利蝗迁入新疆西部边境危害,其通道主要在阿勒泰、伊犁和塔城,因此为避免由于采样造成的误差只

选择了博乐地区的意大利蝗虫种群,而境外迁入的意大利蝗虫与新疆境内意大利蝗虫是否存在遗传差异还有待于研究。

致谢 部分实验在浙江大学生物实验中心基因工程和微生物实验室进行,在此谨致感谢。

参 考 文 献

- 1 钦俊德. 植食性昆虫的食性和营养. 昆虫学报, 1962, 11 (2): 169 ~ 185.
- 2 黄春梅. 新疆巴里坤草原优势种蝗虫食性与蝗科中亚科分类系统关系的研究. 昆虫分类学报, 1995, 17: 128 ~ 133.
- 3 芦荣胜. 中国斑腿蝗科部分种类分子系统学研究(直翅目: 蝗总科). 博士学位论文. 西安: 陕西师范大学, 2005.
- 4 Simon C., Frati F., Beckenbach A., et al. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. Ann. Entomol. Soc. Am., 1994, 87 (6): 651 ~ 701.
- 5 刘殿锋, 蒋国芳, 时号, 等. 应用16S rDNA序列探讨斑腿蝗科的单系性及其亚科的分类地位. 昆虫学报, 2005, 48 (5): 759 ~ 769.