

## 白边大叶蝉线粒体基因组测序与分析

俞鹏飞, 吴国火, 韩宝瑜\*

(中国计量大学生命科学学院, 浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室, 杭州 310018)

**摘要:** 采用引物步移法测得白边大叶蝉 *Kolla paulula* (Walker) 线粒体基因组 90%左右的序列, 并分析了该叶蝉的线粒体基因组特征。基于 23 个物种(半翅目)的蛋白编码基因序列, 以最大似然法和贝叶斯法构建了头喙亚目系统发育树。已测得序列长度为 13 579 bp (AT: 73.33%), 其中包含了 13 个蛋白编码基因、21 个 tRNA 基因和 1 个 rRNA 基因。除了 *ND5* 基因使用 GTT 作为起始密码子外, 其他所有蛋白编码基因均使用 ATN 作为起始密码子; 除了 *CO II* 使用不完整的 T 作为终止密码子, 其他所有蛋白编码基因均使用 TAA 或 TAG 作为终止密码子。21 个 tRNA 基因中, 除了 *tRNASer(AGN)* 缺失 1 个稳定的茎环结构外, 其他所有 tRNA 基因均能形成典型的三叶草二级结构。系统发育分析结果表明, 进化树明显可以被分为沫蝉总科+ (角蝉总科+蜡蝉总科); 白边大叶蝉属于角蝉总科的叶蝉科, 白边大叶蝉线粒体基因组特征与其他叶蝉科昆虫相同。

**关键词:** 白边大叶蝉; 引物步移法; 线粒体基因组; 系统发育

中图分类号: Q75

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2017)05-0874-08

### Sequencing and analysis of the mitochondrial genome of *Kolla paulula* (Walker) (Hemiptera: Cicadellidae)

YU Pengfei, WU Guohuo, HAN baoyu

(Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology and Inspection & Quarantine, College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018)

**Abstract:** About 90% of the mitochondrial genome of *Kolla paulula* (Walker) was sequenced using the primer extraction step method and the mitochondrial genomic characteristics was analyzed in this study. We constructed a phylogenetic tree from 23 species (Hemiptera) based on the nucleotide sequence of 13 mitochondrial protein-coding genes using Bayesian inference and Maximum likelihood. The sequence length was 13579 bp (AT: 73.33%), including 13 protein coding genes, 21 tRNA genes and 1 rRNA gene. All protein coding genes used ATN as initiation codon except *ND5* that used GTT as initiation codon. All protein coding genes used TAA or TAG as stop codon except *CO II* that used incomplete T as stop codon. All of the tRNA genes formed a typical clover secondary structure except *tRNASer(AGN)* that was lack of a stable stem-loop structure among the 21 tRNA genes. The phylogenetic analysis results showed that the phylogenetic tree could be divided into Cercopoidea+(Membracoidea+ Fulgoroidea). The mitochondrial genome of *Kolla paulula* (Membracoidea: Cicadellidae) had the same characteristics as other Cicadellidae.

**Key words:** *Kolla paulula* (Walker); primer step method; mitogenome; phylogen

线粒体基因组由于其母性遗传、进化速率快、组成稳定和排列保守, 很少出现重组等特点, 在系统发育、遗传进化、种群分化和地理隔离等研究中已被广泛应用<sup>[1]</sup>。昆虫线粒体基因组的大小一般在 15~18 kb, 其中包括了 13 个 PCGs(蛋白编码基因)、

2 个 rRNA 基因(核糖体 RNA 基因)、22 个 tRNA 基因(转运 RNA 基因)和 1 个 A+T 富含区<sup>[2]</sup>(控制区)。叶蝉类昆虫隶属于半翅目 Hemiptera 头喙亚目 Auchenorrhyncha, 全世界共有 2 万多种<sup>[3]</sup>, 多数为农林害虫, 给农林业带来了经济损失。该类昆

收稿日期: 2017-04-13

基金项目: 浙江省大学生科技创新项目(2017R409015)和浙江省自然科学基金项目(LY17C140002)共同资助。

作者简介: 俞鹏飞, 硕士研究生。E-mail: ypf2014biocontrol@163.com

\* 通信作者: 韩宝瑜, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: han-insect@263.net

虫不仅危害农林作物, 而且具有传播植物病毒的能力, 导致植物死亡, 比如凹大叶蝉 (*Bothrogonia ferruginea*) 和白边大叶蝉 (*Kolla paulula*) 是传播葡萄皮尔斯病菌的媒介昆虫<sup>[4-5]</sup>; 甜菜叶蝉 (*Circulifer tenellus*) 能够传播卷顶病, 导致甜菜停止生长<sup>[6]</sup>。白边大叶蝉隶属于半翅目角蝉总科叶蝉科, 属于渐变态昆虫, 生长周期一般分为卵、若虫和成虫。主要寄主为花椒、果树和灌木。目前, NCBI 总共收录了 7 种完整的叶蝉科昆虫线粒体基因组数据, 而已知的叶蝉种数非常巨大, 因此要基于线粒体基因解决叶蝉类昆虫系统发育关系, 现在所得到的分子数据是非常匮乏的。基于形态学和生态特征的研究是早期对于叶蝉类昆虫的研究<sup>[7-9]</sup>, 基于线粒体基因单个或多个蛋白编码基因对叶蝉科昆虫的系统发育关系也越来越多<sup>[10-11]</sup>。20 世纪 90 年代开始, Dietrich 等学者对叶蝉科昆虫进行了分子系统学的研究, 使用 12S rDNA 和 *ND1* 对黄翅叶蝉属进行了系统发育研究, 研究结果与形态学研究基本一致<sup>[12]</sup>; 基于 28S rDNA 序列和形态学数据分析得到使用形态学和分子数据相互结合的分析比单独分开分析结果更理想<sup>[13]</sup>, 但是叶蝉科内部的系统发育关系并没有得到解决, 取样的大小和数据量的不足仍然是首先要解决的问题。本研究仅对白边大叶蝉线粒体基因组数据进行了分析, 因此, 需要快速并准确地得到更多的分子数据, 并结合形态学等证据来阐明叶蝉科昆虫的分子进化和系统发育关系。

本研究对白边大叶蝉 *Kolla paulula* (Walker) 线粒体基因组进行了测序与分析, 基于 13 种蛋白编码基因构建了系统发育树。测定和分析白边大叶蝉线粒体基因组序列不仅对该科的系统发育具有重要意义, 而且为昆虫分子进化积累了数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

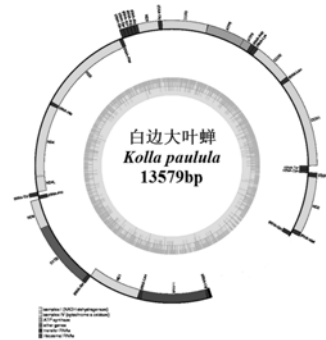
供试虫源: 实验所用白边大叶蝉于 2014 年 7 月在浙江省丽水市大姆山 (28°28'N, 119°55'E) 海拔 750 m 的有机茶园中捕捉得到, 浸泡于无水酒精中, 保存于中国计量大学天问科技楼 304 实验室-20 °C 冰箱备用, 承蒙蔡平教授鉴定学名。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 总 DNA 提取** 取单头白边大叶蝉, 除去其腹部后将样品放入无菌的 1.5 mL 离心管中, 使用无菌研磨棒将其磨成粉末状, 然后按照动物组织快速提取试剂盒 (VWI) 说明书提取总 DNA, 提取完的 DNA 样品使用 Nanodrop 2000C 仪器 (Thermo

Scientific 公司) 和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其浓度和纯度后马上保存于-20 °C 冰箱备用。

**1.2.2 PCR 扩增与测序** 引物通过文献查找, 筛选其中的 8 对效果好的引物<sup>[14]</sup>。引物具体信息见表 1。实验所用引物均有上海桑尼有限公司合成。



黄色部分表示 7 个 NADH 脱氢酶基因; 淡紫色部分表示 3 个细胞色素氧化酶基因; 青色部分表示 2 个腺苷三磷酸酶基因; 蓝色部分表示 21 个 tRNA 基因; 红色部分表示 16S rRNA 基因; 深紫色部分表示细胞色素 b 基因

The yellow indicated 7 NADH dehydrogenase genes; the pale purple indicated 3 cytochrome oxidase genes; The green indicated 2 ATP genes; the blue indicated 21 transfer RNA genes; the red indicated 16 ribosomal RNA gene; the purple indicated cytochrome b gene

图 1 环状图片为白边大叶蝉线粒体基因组。所有扩增片段的引物都来源于文献<sup>[14]</sup>

Figure 1 Circular map of the mitochondrial genome of *Kolla paulula*. All the primers of amplified fragments were from the reference<sup>[14]</sup>

PCR 反应体系中包括 10×PCR LaBuffer (含 Mg<sup>2+</sup>) 1.5 μL, dNTP (2.5 mmol·L<sup>-1</sup>) 2.4 μL, 模板 DNA 0.5 μL, 10 μmol·L<sup>-1</sup> 上下游引物各 0.6 μL, LaTaq DNA Polymerase (TaKaRa) 0.15 μL, 加 ddH<sub>2</sub>O 补齐至 15 μL。

PCR 反应程序为 94 °C 预变性 3 min, 然后 94 °C 变性 15 s, 56 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 2~3 min, 共计 40 个循环, 最后延长延伸 10 min。PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳检测合格后由上海桑尼有限公司进行直接测序。

**1.2.3 序列编辑与分析** 测序后得到的结果使用 Chromas 软件进行读取, 使用 DNASTar<sup>[15]</sup> 进行序列拼接及校对, 获得质量比较高的部分。tRNA 基因使用 tRNAscan-SE Search Server<sup>[16]</sup> (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>) 在线查找工具, 并预测二级结构, 无法从 tRNAscan-SE Search Server 得到的 tRNA 基因与其他叶蝉科昆虫的核苷酸序列进行比较后得到。13 个蛋白编码基因和 1 个 rRNA 基因通过 MEGA5.1<sup>[17]</sup> 与其他已测叶蝉科昆虫进行比对后

得到。密码子使用和核苷酸组成通过 MEGA5.1 计算获得。基因重叠区与间隔区的统计手动完成。核苷酸序列的碱基组成偏向性根据下面的公式进行计

算： $AT-skew=[A-T]/[A+T]$ ，和  $GC-skew=[G-C]/[G+C]$ <sup>[18]</sup>。基因组序列使用 Sequin 提交至 NCBI（登录号为 KY680277）。

表 1 白边大叶蝉线粒体基因扩增引物

Table 1 Primers used for amplification of the mitogenome of *Kolla paulula*

序号 Number	引物序列 (J/N) 5' → 3' Primer sequence (J/N) 5' → 3'
1	TGATTCTTTGGWCACCCWGAAGT/CCACAAATTTCTGAACATTG
2	GGCAGATTAGTGAAATGRATTTAA/CGAGTTAYATCTCGTCATCATTG
3	GTTGATTATAGACCWTGRCC/TATATTTAGAGYATRAYAYTGAAG
4	CCATTTGAATGTGGRTTTGAYCC/TTAGGTTGRGATGGNYTAGG
5	TTAAATCCTTWGARTAAAAYCC/TGAGGTTATCAACCNARCG
6	GAAACAGGAGCCTCAACATGWGC/TATCTACAGCRAATCCYCCYCA
7	GTTCTACCTTGAGGNCAAATRTC/TTACCTTAGGGATAACAGCGTAA
8	CCGGTTTGAACCTCARATCATGTA/GTGCCAGCAGYYGCGGTTANAC

Note: W=(A/T) Y=(C/T) N=(A/C/G/T) R=(A/G).

## 2 结果与分析

### 2.1 基因组结构与碱基组成

在所测得的 13 579 bp 序列中，包含了 13 个蛋白编码基因，1 个 rRNA 基因，21 个 tRNA 基因（见图 1）。在已得到的基因序列中，其基因排列顺序与果蝇线粒体基因排列顺序一致。其中发现的基因间隔总共有 13 处，总长度为 77 bp，大小从 1~18 bp 不等，最大的基因间隔发生在 *tRNAAla* 和 *tRNAArg* 之间；发生基因重叠的区域共有 11 处，总长度为 42 bp，大小从 1~8 bp 不等，最长的基因重叠区域位于 *tRNATrp* 和 *tRNACys*。*ATP8/ATP6* 所在的基因重叠均为 7 bp，但是 *ND4/ND4L* 却未有基因重叠和基因间隔。基因分布见表 2，其中有 14 个 tRNA 基因和 9 个蛋白编码基因有 J 链编码，7 个 tRNA 和 4 个蛋白编码基因由 N 链编码。在所测得的白边大叶蝉线粒体基因中 ATCG 4 种核苷酸的含量分别为 41.00%、32.33%、15.05% 和 11.63%。AT 偏斜率大小为 11.82%，GC 偏斜率为 -12.82%，具有明显的 AT 偏向性。这与大部分其他的叶蝉科昆虫类似。AT-SKEW 大多数为正值，其中少数负值也非常接近于 0，因此，整体上 A 的含量大于 T；但是 GC-SKEW 则基本为负值，表明 G 的含量明显大于 C（表 3）。

### 2.2 蛋白编码基因和密码子使用情况

白边大叶蝉 13 个蛋白编码基因的总长度为 10 981 bp，其中 *ND1*、*ND4*、*ND4L* 和 *ND5* 位于 N 链，而其余 9 个蛋白编码基因则位于 J 链。AT 含量为 71.81%，GC 含量 28.19%。除了 *ND5* 基因使用 GTT 作为起始密码子外，其他所有蛋白编码基因均使用 ATN 作为起始密码子，其中 *ND2*、*CO II*、*ATP8*、

*ATP6*、*ND3* 和 *NAD1* 使用 ATA 作为起始密码子，*ATP6*、*CO III*、*ND4* 和 *CYTB* 使用 ATG 作为起始密码子，*CO I* 和 *NAD4L* 使用 ATT 作为起始密码子。12 个蛋白编码基因使用常见的三联体密码子（TAA 和 TAG）作为终止密码子，除了 *CO II* 使用不完整的 T 作为终止密码子，其中 *ND2*、*ND5*、*ND4* 和 *CYTB* 使用 TAG 作为终止密码子，其他 8 个蛋白编码基因使用 TAA 作为终止密码子。在 13 个蛋白编码基因中，AT 含量最高的基因是 *ATP8*（80.39%），最低的基因为 *CO I*（66.22%），这与其他昆虫所得到的结果一致。白边大叶蝉的相对同义密码子（RSCU）见表 4。13 个蛋白编码基因总共有 3 648 个密码子（不包含终止密码子），使用频率最高的密码子是 AUU（Ile），最低的是 CGC（Arg）。使用频率最高的氨基酸是 Ile，最低的是 Arg。7 中富含 AT 的氨基酸的密码子（编码 Asn、Ile、Leu2、Met、Phe、Tyr 和 Lys）出现了 1 885 次，占总密码子的 51.6%。A 和 U 的出现频率高于 G 和 C，NNU 和 NNA 的相对同义密码子使用频率（RSCU）基本都大于 1，说明第 3 位密码子富含 AT。

### 2.3 转录 RNA 基因和核糖体 RNA 基因

在所测得的序列中，共获得 21 个 tRNA 基因，大小从 61 到 72 bp 不等，9 个由负链编码，其他 12 个均位于正链。其中 20 个 tRNA 均为典型的三叶草结构，*tRNASer*（AGN）缺失一个稳定的茎环结构。在昆虫线粒体基因中，tRNA 基因的 2 级结构普遍存在着 G=U、A=A、U=U、C=A 和 U=C 等非经典配对。其中，G=U 出现 27 次，U=U 出现 4 次，A=A 和 C=A 出现 1 次，没有发现 U=C 配对。

白边大叶蝉中的 16S rRNA 位置位于

*tRNA<sup>Leu</sup>(CUN)* 和 *tRNA<sup>Val</sup>* 之间, 大小为 1 173 bp, AT 含量为 83.12%。*16S rRNA* 与 *tRNA<sup>Leu</sup>(CUN)* 和 *tRNA<sup>Val</sup>* 都没有基因间隔。

## 2.4 系统发育关系

本研究将白边大叶蝉和 GenBank 中 7 种叶蝉、7 种蜡蝉、7 种沫蝉和 1 种粉虱 (表 5) 的 13 个蛋白编码基因进行了系统发育分析, 使用 *Bemisia tabaci*<sup>[19]</sup> 作为外群。PCGs 基于氨基酸密码子编码规则使用 MEGA5.1 进行连配。使用贝叶斯法和最大似然法进行系统发育分析, 所选最优模型由 MEGA5.1 进行筛

选得到。最优模型分别为为 mtREV24 + G + I 和 GTR + G + I 模型。贝叶斯法分析使用 MrBayes3.1.2<sup>[20]</sup>, 参数设置为: 4 个马尔科夫链, 共运行 100 万代, 每 100 代取样一次, 抽取燃烧掉其中的 25%。最大似然法分析使用 PHYMLonline web server<sup>[21]</sup>, 参数设置为: 平衡平率为 “empirical”, proportion of invariable sites 为 “estimated”, 替换模型 (Perform bootstrap) 为 GTR, 树形改良 (Type of tree improvement) 为 NNI, 替代率数量分类为 4, 伽马形参数为 “estimated”, 开始树为 “BIONJ”。

表 2 白边大叶蝉线粒体基因组结构

Table 2 Gene organization of the *Kolla paulula* mitogenome

基因 Gene	方向 Strand	基因位置 Gene position	长度/bp Length	反向/起始密码子 Anti/start codon	终止密码子 Stop codon	基因间隔 Intergenic nucleotide
<i>tRNAGln</i>	N	1~68	69	TTG		0
<i>tRNAMet</i>	J	86~152	67	CAT		17
<i>ND2</i>	J	153~1 127	975	ATA	TAG	0
<i>tRNATrp</i>	J	1 129~1 200	72	TCA		1
<i>tRNACys</i>	N	1193~1253	61	GCA		-8
<i>tRNATyr</i>	N	1 259~1 325	67	GTA		5
<i>CO I</i>	J	1 324~2 877	1 554	ATT	TAA	-2
<i>tRNA<sup>Leu</sup>(UUR)</i>	J	2 879~2 945	67	TAA		1
<i>CO II</i>	J	2 946~3 630	685	ATA	T	0
<i>tRNALys</i>	J	3 628~3 697	70	CTT		-3
<i>tRNAAsp</i>	J	3 706~3 768	63	GTC		8
<i>ATP8</i>	J	3 769~3 921	153	ATA	TAA	0
<i>ATP6</i>	J	3 915~4 568	654	ATG	TAA	-7
<i>CO III</i>	J	4 570~5 349	780	ATG	TAA	1
<i>tRNAGly</i>	J	5 355~5 417	63	TCC		5
<i>ND3</i>	J	5 418~5 771	354	ATA	TAA	0
<i>tRNAAla</i>	J	5 790~5 858	69	TGC		18
<i>tRNAArg</i>	J	5 860~5 926	67	TCG		1
<i>tRNAAsn</i>	J	5 921~5 988	68	GTT		-6
<i>tRNASer(AGN)</i>	J	5 988~6 055	68	GCT		-1
<i>tRNAGlu</i>	J	6 055~6 120	66	TTC		-1
<i>tRNAPhe</i>	N	6 119~6 186	68	GAA		-2
<i>ND5</i>	N	6 187~7 863	1 677	GTT	TGA	0
<i>tRNAHis</i>	N	7 861~7 922	62	GTG		-3
<i>ND4</i>	N	7 933~9 246	1 314	ATG	TAG	10
<i>ND4L</i>	N	9 247~9 522	276	ATT	TAA	0
<i>tRNAThr</i>	J	9 525~9 587	63	TGT		2
<i>tRNAPro</i>	N	9 588~9 652	65	TGG		0
<i>ND6</i>	J	9 655~1 0137	483	ATA	TAA	2
<i>CYTB</i>	J	10 144~11 280	1 137	ATG	TAG	6
<i>tRNASer(UCN)</i>	J	11 279~11 341	63	TGA		-2
<i>ND1</i>	N	11 335~12 273	939	ATA	TAA	-7
<i>tRNA<sup>Leu</sup>(CUN)</i>	N	12 274~12 339	66	TAG		0
<i>1rRNA</i>	N	12 340~13 512	1 173			0
<i>tRNA<sup>Val</sup></i>	N	13 513~13 579	67	TAC		0

注: \*表示基因间隔, 负数表示相邻基因间重叠的核苷酸数。J 表示基因 5' → 3' 方向; N 表示基因 3' → 5' 方向。

Note: \* indicates the intergenic spacer, negatives indicate the nucleotide numbers of gene overlap. J indicates the direction of gene 5' → 3'; N indicates the direction of gene 3' → 5'.

表 3 白边大叶蝉线粒体基因组核苷酸组成分析

Table 3 Nucleotide composition of *Kolla paulula* mitochondrial genome

基因 Gene	A 含量/% A	T 含量/% T	C 含量/% C	G 含量/% G	A+T 含量/% A+T	G+C 含量/% G+C	AT 偏斜/% AT-SKEW	GC 偏斜/% GC-SKEW	长度/bp Length
Whole genome	41.00	32.33	15.05	11.63	73.33	26.67	11.82	-12.82	13 579
16S rRNA	50.81	32.31	10.49	6.39	83.12	16.88	22.26	-24.29	1 173
tRNA	38.42	38.27	10.07	13.24	76.69	23.31	0.20	13.60	1 390
13PCGS	39.91	31.89	15.88	12.31	71.81	28.19	11.17	-12.66	10 981
ND2	38.26	36.51	15.08	10.15	74.77	25.23	2.34	-19.54	975
COI	30.76	35.46	17.63	16.15	66.22	33.78	-7.10	-4.38	1 554
COII	37.81	31.39	17.66	13.14	69.20	30.80	9.28	-14.68	685
ATP8	47.71	32.68	11.76	7.84	80.39	19.61	18.70	-19.99	153
ATP6	35.32	37.16	16.21	11.31	72.48	27.52	-2.54	-17.81	654
COIII	33.21	33.97	17.56	15.26	67.18	32.82	-1.13	-7.01	780
ND3	36.44	40.11	12.71	10.73	76.55	23.45	-4.79	-8.44	354
ND5	46.93	27.31	14.79	10.97	74.24	25.76	26.43	-14.83	1 677
ND4	47.56	26.64	13.77	12.02	74.20	25.80	28.19	-6.78	1 314
ND4L	50.36	29.35	11.96	8.33	79.71	20.29	26.36	-17.89	276
ND6	42.24	36.02	13.46	8.28	78.26	21.74	7.95	-23.83	483
CYTB	32.10	35.88	17.94	14.07	67.99	32.01	-5.56	-12.09	1137
ND1	49.09	22.26	17.57	11.08	71.35	28.65	37.60	-22.65	939

表 4 白边大叶蝉线粒体基因组蛋白编码基因密码子使用统计

Table 4 The codon usage from protein coding genes of the mitochondrial genome of *Kolla paulula*

氨基酸 AA	密码子 Codon	使用次数 Number	RSCU	氨基酸 AA	密码子 Codon	数量 Number	RSCU	
Ala(A)	gca	56	1.37	Lys(K)	aaa	78	1.50	
	gcc	18	0.44		aag	26	0.50	
	gcg	7	0.17		Met(M)	aua	267	1.63
	gcu	37	0.90			aug	61	0.37
Arg(R)	cga	31	2.48	Phe(F)	uuc	58	0.37	
	cgc	4	0.32		uuu	252	1.63	
	cgg	5	0.40		Pro(P)	cca	53	1.67
cgu	10	0.80	ccc	21		0.66		
Asn(N)	aac	30	0.38	ccg		8	0.25	
	aau	130	1.62	ccu	45	1.42		
Asp(D)	gac	25	0.85	Ser(S)	aga	87	2.47	
	gau	34	1.15		agc	14	0.40	
Cys(C)	ugc	12	0.44	agg	6	0.17		
	ugu	42	1.56	agu	34	0.96		
Gln(Q)	caa	47	1.57	uca	119	1.90		
	cag	13	0.43	ucc	21	0.33		
Glu(E)	gaa	53	1.31	ucg	8	0.13		
	gag	28	0.69	ucu	103	1.64		
Gly(G)	gga	62	1.27	Thr(T)	aca	74	1.73	
	ggc	18	0.37		acc	35	0.82	
	ggg	58	1.18		acg	9	0.21	
	ggu	58	1.18		acu	53	1.24	
His(H)	cac	22	0.67	Trp(W)	uga	71	1.60	
	cau	44	1.33		ugg	18	0.40	
Ile(I)	auc	67	0.34	Tyr(Y)	uac	56	0.59	
	auu	329	1.66		uau	135	1.41	
Leu(L)	cua	87	1.01	Val(V)	gua	78	1.72	
	cuc	11	0.13		guc	15	0.33	
	cug	21	0.24		gug	12	0.27	
	cuu	70	0.82		guu	76	1.68	
	uua	265	3.09					
	uug	61	0.71					

注: RSCU: 相对同义密码子使用频率。Note: RSCU: Relative synonymous codon usage.

表 5 22 种头喙亚目昆虫和 1 种外群线粒体基因组系统发育分析使用的物种和序列信息

Table 5 The species and related sequence information used in phylogenetic analysis of 22 Auchenorrhyncha and one outgroup

总科 Superfamily	科 Family	种 Species	登录号 Accession ID	长度/bp Length
Membracoidea	Cicadellidae	<i>Kolla paulula</i>	KY680277	13 579
Membracoidea	Cicadellidae	<i>Empoasca vitis</i>	NC024838	15 154
Membracoidea	Cicadellidae	<i>Tambocerus</i> sp.	KT827824	15 955
Membracoidea	Cicadellidae	<i>Homalodisca vitripennis</i>	NC006899	15 304
Membracoidea	Cicadellidae	<i>Idioscopus nitidulus</i>	KR024406	15 287
Membracoidea	Cicadellidae	<i>Nephotettix cincticeps</i>	NC026977	14 805
Membracoidea	Aetalionidae	<i>Darthula hardwickii</i>	NC026699	15 355
Membracoidea	Membracidae	<i>Leptobelus gazella</i>	JF801955	16 007
Cercopoidea	Cercopidae	<i>Aeneolamia contigua</i>	NC025495	15 613
Cercopoidea	Cercopidae	<i>Abidama producta</i>	NC015799	15 277
Cercopoidea	Cercopidae	<i>Callitettix versicolor</i>	EU725832	15 374
Cercopoidea	Cercopidae	<i>Cosmoscarta bispecularis</i>	NC026289	15 426
Cercopoidea	Cercopidae	<i>Paphnutius ruficeps</i>	NC021100	14 841
Cercopoidea	Aphrophoridae	<i>Philaenus spumarius</i>	AY630340	16 324
Cercopoidea	Cercopidae	<i>Callitettix braconoides</i>	NC025497	15 637
Fulgoroidea	Flatidae	<i>Geisha distinctissima</i>	FJ230961	15 971
Fulgoroidea	Fulgoridae	<i>Lycorma delicatula</i>	FJ456942	15 410
Fulgoroidea	Ricaniidae	<i>Ricania marginalis</i>	JN242415	15 698
Fulgoroidea	Issidae	<i>Sivaloka damnosus</i>	FJ360694	15 287
Fulgoroidea	Delphacidae	<i>Laodelphax striatellus</i>	FJ360695	16 513
Fulgoroidea	Delphacidae	<i>Nilaparvata lugens</i>	NC021748	17 619
Fulgoroidea	Delphacidae	<i>Sogatella furcifera</i>	NC021417	16 612
Aleyrodoidea	Aleyrodidae	<i>Bemisia tabaci</i>	JQ906700	15 632

头喙亚目内的 3 个总科（角蝉总科、蜡蝉总科和沫蝉总科）的系统关系存在 3 种不同的假设：1、沫蝉总科+（角蝉总科蜡蝉总科），2、角蝉总科+（蜡蝉总科+沫蝉总科），3、蜡蝉总科+（角蝉总科+沫蝉总科）。本研究所得到的结果与第 1 种一致。

通过贝叶斯法得到的树中，其节点的后验率均为 100，从图 2（B）中可以看出头喙亚目内部的系统发育关系为沫蝉总科+（角蝉总科+蜡蝉总科），这与 Wu 等<sup>[22]</sup>的研究结果有所不同：蜡蝉总科+（角蝉总科+沫蝉总科），支持第 3 种。而在 Yu<sup>[23]</sup>的研究中，角蝉总科和（蜡蝉总科+沫蝉总科）互为姐妹群，则是支持第 2 种，可能是使用的方法不同造成的结果。

利用最大似然法（图 2（A））构建的系统发育树得到的结果几乎与贝叶斯法构建的系统发育树一致，其拓扑结构非常相似，各节点的支持率也非常高，只有青蛾蜡蝉 *Geisha distinctissima*<sup>[24]</sup>所在的节点出现了较低的现象。不同的点是黑尾叶蝉 *Nephotettix cincticeps* 和白边大叶蝉 *Kolla paulula* 之间的关系：贝叶斯法分析得到黑尾叶蝉+（白边大叶蝉+（齿茎叶蝉+羚羊角蝉）），而最大似然法

分析得到（黑尾叶蝉+白边大叶蝉）+（齿茎叶蝉+羚羊角蝉）。

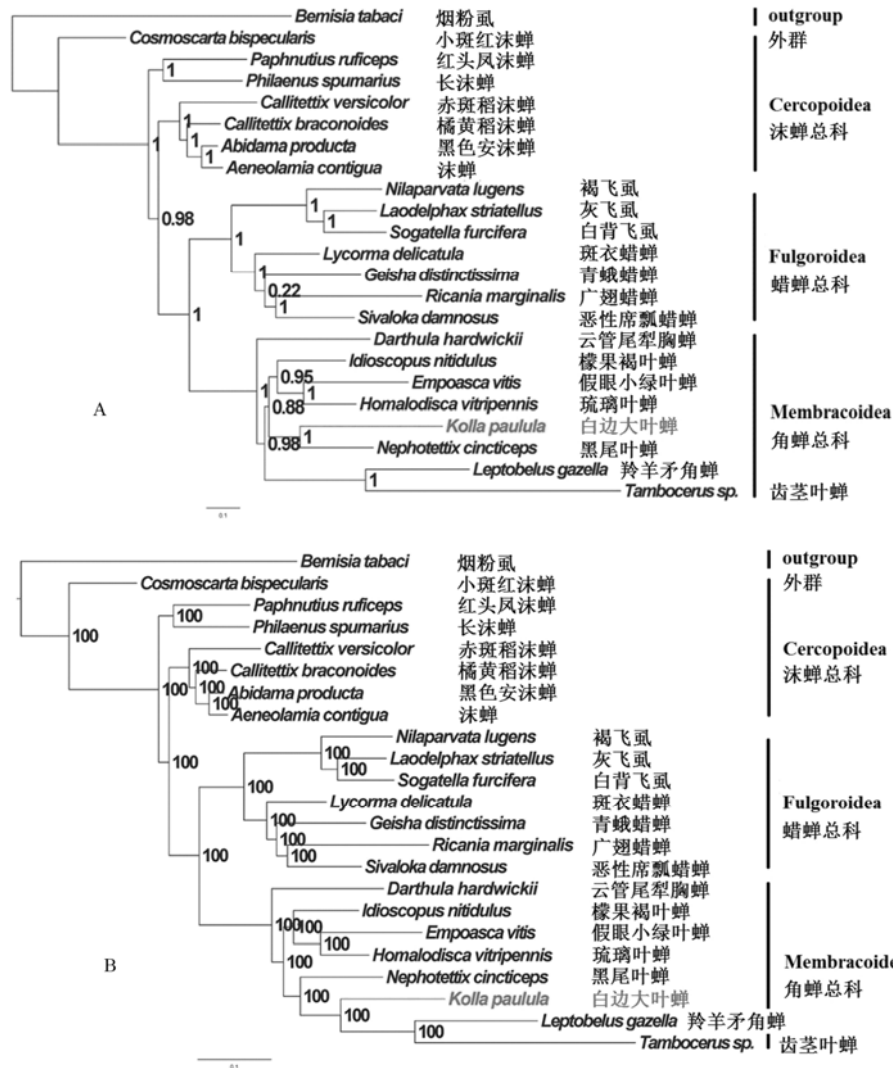
### 3 讨论

本研究未得到的序列位于 *12S rRNA-tRNAIle*，包括 *12S rRNA*，控制区和 *tRNAIle*，使用 PCR 扩增得到了该序列目标条带，但是由于 AT 含量过高，测序困难，无法测得完整的该序列。

截止 2017 年 2 月为止，在 GenBank 中所得到的完整叶蝉科昆虫线粒体基因组有 7 种，本研究测得了白边大叶蝉线粒体基因组 90%左右的序列。在所测得的部分中，其基因排列顺序与其他叶蝉类昆虫完全一致，所有的基因长度都在昆虫线粒体基因长度的范围之内。基因间隔的区域总共有 13 处，基因重叠的区域共有 11 处。*ATP8* 和 *ATP6* 所在的基因重叠区为 7 bp，这也是半翅目昆虫线粒体基因普遍所有的特点<sup>[25-30]</sup>，而在蚜科昆虫的线粒体基因中发现，*ATP8* 和 *ATP6* 所存在的重叠区往往大于 10 bp，甚至有的蚜虫高达 20 bp<sup>[31]</sup>。*ND4* 和 *ND4L* 没有重叠区域，而在其他许多昆虫中会出现 7 bp 大小的重叠区域。A+T 含量为 73.33%，和其他叶蝉类昆

虫类似。白边大叶蝉蛋白编码基因的起始密码子(除了 *ND5* 使用 *GTT* 作为起始密码子), 终止密码子都为完整密码子 *TAG* 或 *TAA* 和不完整密码子 *T*, 这都是昆虫线粒体基因中常见的密码子。A 和 U 使用

的频率远远大于 G 和 C, 并且 *NNU* 和 *NNA* 的使用频率最高。



*Aeneolamia contigua* 缺少中文学名。Note: *Aeneolamia contigua* lacks Chinese scientific name

图 2 基于 13PCGs 的 23 个头喙亚目线粒体基因使用贝叶斯法 (BI) 和最大似然法 (ML) 构建的系统发育树 (A (ML), B (BI))。分支之上的节点支持值为引导值

Figure 2 The 13PCGs of Auchenorrhyncha based on bayesian method (BI) and maximum likelihood (ML) (A (ML), B (BI)). The node support values above the branches are the bootstrap values

基于 13 个蛋白编码基因, 使用贝叶斯法和最大似然法构建了系统发育树, 结果显示它们系统发育树的拓扑结构基本一致, 头喙亚目主要包括角蝉总科、沫蝉总科和蜡蝉总科 3 个总科, 这与之前的相关研究一致。对于种内而言, 黑尾叶蝉和白边大叶蝉的关系却不是很明显, 这需要扩大取样量来增加分子数据, 并结合其他分子标记 (比如核基因标记) 和形态学来较为全面地进行探讨和研究。线粒体基因序列在解决高级阶元的系统发育关系中具有重要

意义。因此, 本研所得到的分子数据, 对于未来解决叶蝉类昆虫系统分类问题提供了支持。

参考文献:

[1] YUAN M L, ZHANG Q L, GUO Z L, et al. Comparative mitogenomic analysis of the superfamily Pentatomoidea (Insecta: Hemiptera: Heteroptera) and phylogenetic implications[J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 460.  
 [2] 郭仲龙, 袁明龙. 半翅目昆虫线粒体基因组学研究进展[J]. 中国科学:生命科学, 2016(2): 151-166.  
 [3] ZHONG H, ZHANG Y, WEI C. Morphology and ultra-

- structure of the malpighian tubules in *Kolla paulula*, (Hemiptera: Cicadellidae)[J]. Zool Anz, 2015, 257: 22-28.
- [4] 张熏尹. 黑尾大叶蝉 (*Bothrogonia ferruginea*) 生活史及媒介葡萄皮尔斯病之传播效率探讨[D]. 台中:中兴大学, 2014.
- [5] TUAN S J, HU F T, CHANG H Y, et al. Xylella fastidiosa transmission and life history of two Cicadellinae sharpshooters, *Kolla paulula* and *Bothrogonia ferruginea* (Hemiptera: Cicadellidae), in Taiwan[J]. J Econ Entomol, 2016, 109(3): 1034-1040.
- [6] CREAMER R, CARPENTER J, RASCON J. Incidence of the beet leafhopper, *Circulifer tenellus* (Homoptera: Cicadellidae) in New Mexico chile[J]. Southwest Entomol, 2003, 28(3): 177-182.
- [7] 葛钟麟. 中国经济昆虫志: 第 10 册, 同翅目: 叶蝉科[M]. 北京:科学出版社, 1966: 60-62.
- [8] METCALF Z P. General catalogue of the Homoptera. Fascicle VI, Cicadelloidea. Part 1, Tettigellidae [M]. Washington D C:United States Department of Agriculture, 1965.
- [9] CARVER M, GROSS G F, WOODWARD T E. Hemiptera (bugs, leafhoppers, cicadas, aphids, scale insects etc.)[J]. The insects of Australia, 1991, 1: 429-509.
- [10] FANG Q, BLACK IV W C, BLOCKER H D, et al. A phylogeny of New World Deltocephalus-like leafhopper genera based on mitochondrial 16S ribosomal DNA sequences[J]. Mol Phylogenet Evol, 1993, 2(2): 119-131.
- [11] TAKIYA D M, TRAN P L, DIETRICH C H, et al. Co-cladogenesis spanning three phyla: leafhoppers (Insecta: Hemiptera: Cicadellidae) and their dual bacterial symbionts[J]. Molecular Ecology, 2006, 15(13): 4175-4191.
- [12] DIETRICH C H, FITZGERALD S J, HOLMES J L, et al. Reassessment of *Dalbulus leafhopper* (Homoptera: Cicadellidae) phylogeny based on mitochondrial DNA sequences[J]. Ann Entomol Soc Am, 1998, 91(5): 590-597.
- [13] DIETRICH C H, DMITRIEV D A, RAKITOV R A, et al. Phylogeny of Cicadellidae (Cicadomorpha: Membracoidea) based on combined morphological and 28S rDNA sequence data[C]// California : 12th International Auchenorrhyncha Congress, Berkeley, CA. 2005: 7-12.
- [14] SIMON C, BUCKLEY T R, FRATI F, et al. Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA[J]. Annu Rev Ecol Syst, 2006, 37: 545-579.
- [15] BURLAND T G. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software[M]//MISENER S, KRAWETZ S A. Bioinformatics methods and protocols. Totowa: Humana Press, 1999: 71-91.
- [16] LOWE T M, EDDY S R. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(5): 955-964.
- [17] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Mol Biol Evol, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [18] PERNA N T, KOCHER T D. Unequal base frequencies and the estimation of substitution rates[J]. Mol Biol Evol, 1995, 12(2): 359-361.
- [19] WANG H L, YANG J, BOYKIN L M, et al. The characteristics and expression profiles of the mitochondrial genome for the Mediterranean species of the *Bemisia tabaci* complex[J]. BMC Genomics, 2013, 14(1): 401-415.
- [20] HUELSENBECK J P, RONQUIST F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees[J]. Bioinformatics, 2001, 17(8): 754-755.
- [21] GUINDON S, GASCUEL O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood[J]. Systematic Biol, 2003, 52(5): 696-704.
- [22] WU Y, DAI R, ZHAN H, et al. Complete mitochondrial genome of *Drabescoides nuchalis* (Hemiptera: Cicadellidae)[J]. Mitochondrial DNA A, 2016, 27(5): 3626-3627.
- [23] YU P, WANG M, CUI L, et al. The complete mitochondrial genome of *Tambocerus* sp. (Hemiptera: Cicadellidae)[J]. Mitochondr DNA, 2017, 28(1): 133-134.
- [24] SONG N, LIANG A P. The complete mitochondrial genome sequence of *Geisha distinctissima* (Hemiptera: Flatidae) and comparison with other hemipteran insects[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2009, 41(3): 206-216.
- [25] ZHOU N, WANG M, CUI L, et al. Complete mitochondrial genome of *Empoasca vitis* (Hemiptera: Cicadellidae)[J]. Mitochondrial DNA Part A, 2016, 27(2): 1052-1053.
- [26] LIANG A P, GAO J, ZHAO X. Characterization of the complete mitochondrial genome of the treehopper *Darthula hardwickii* (Hemiptera: Aetalionidae)[J]. Mitochondrial DNA Part A, 2016, 27(5): 3291-3292.
- [27] WU Y, DAI R, ZHAN H, et al. Complete mitochondrial genome of *Drabescoides nuchalis* (Hemiptera: Cicadellidae)[J]. Mitochondrial DNA A, 2016, 27(5): 3626-3627.
- [28] ZHAO X, LIANG A P. Complete DNA sequence of the mitochondrial genome of the treehopper *Leptobelus gazella* (Membracoidea: Hemiptera)[J]. Mitochondrial DNA Part A, 2016, 27(5): 3318-3319.
- [29] HUNNICUTT L E, HUNTER W B, MOZORUK J J. The complete mitochondrial genome of the blue-green sharpshooter, *Graphocephala atropunctata* (Hemiptera: Cicadellidae)[C]//Entomological Society of America Meeting. Reno: 2008.
- [30] YANG H, LIU J, LIANG A. The complete mitochondrial genome of *Cosmoscarata bispecularis* (Hemiptera, Cicadomorpha, Cercopoidea, Cercopidae)[J]. Mitochondrial DNA Part A, 2016, 27(6): 3957-3958.
- [31] 牛芳芳, 陈静, 姜立云, 等. 两种毛蚜线粒体基因组比较分析[J]. 应用昆虫学报, 2016, 53(6):1288-1300.