

五节根蚜亚科 (半翅目: 蚜总科: 瘦绵蚜科) 基于线粒体基因 COII 的分子系统学研究

张合彩¹, 乔格侠^{2*}

(1. 河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453007; 2 中国科学院动物研究所)

摘要: 五节根蚜亚科蚜虫大多营异寄主全周期生活, 具有明显的原生寄主专一性, 且能在原生寄主上形成形态各异的虫瘿, 因此成为一个倍受关注的类群。但是亚科内族的划分问题却一直存在争议。基于线粒体基因 CO II 部分序列, 用 PAUP^{*} 4.0 Q M iBayes3.0 等软件分别构建了该亚科的 MP 树、ML 树和贝叶斯树, 研究了五节根蚜亚科的系统发育关系。结果显示 3 种算法所构建的系统树都强烈支持五节根蚜亚科是一个单系; 系统树明显分为两大分支, 提示该亚科下分两个族。将蚜虫主要形态特征及其原生寄主植物信息对应到系统树上, 经分析认为这两大分支分别对应倍蚜族和五节根蚜族。依据 DNA 分类理论, 基于系统树的拓扑结构及序列间遗传距离, 初步推测未知种 No. 16961 是肚倍蚜 *Kaburagia rhusicola*, 但究竟是哪一个亚种尚不确定。

关键词: 五节根蚜亚科; COII; 五节根蚜族; 倍蚜族; 分子系统学

中图分类号: Q969.35; Q731 文献标识码: A 文章编号: 1000-7083(2008)05-0754-04

Molecular Phylogeny of Fordinae (Homiptera: Aphidoidea: Pemphiginae) Inferred from Mitochondrial Gene COII

ZHANG He-cai¹, QIAO Ge-xia^{2*}

(1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang, Henan Province 453007, China

2. Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences)

Abstract The subfamily Fordinae is a fascinating group because of its complicated life history, primary host specificity and gall forming characteristic. The COII-based phylogenetic trees with three algorithms MP, ML and Bayesian all strongly suggest that Fordinae is a monophyletic group with two clades corresponding to its two tribes. Some morphological characters and primary host plants of aphids were mapped on to the phylogenetic tree to analyze the division of tribes in it. Results suggest that the viewpoint that Fordinae divided into tribes Melaphilini and Fordini is more appropriate. Based on DNA taxonomy according to the clustering results of the phylogenetic trees and the genetic distance analysis, the unknown sample No. 16961 is probably *Kaburagia rhusicola*, but belonging to which subspecies still needs further study.

Key words Fordinae; COII; Fordini; Melaphilini; molecular phylogenetics

五节根蚜亚科隶属于半翅目蚜总科瘦绵蚜科(张广学, 钟铁森, 1983)。该亚科蚜虫生活史复杂, 包括全周期生活型和不全周期生活型。营不全周期生活的蚜虫种类在禾本科杂草根部或苔藓植物上终年进行孤雌生殖; 然而该亚科大部分种类都是异寄主全周期生活型, 并且有极强的原生寄主专一性, 其原生寄主均为漆树科 Anacardiaceae 黄连木属 *Pistacia* 或盐肤木属 *Rhus* 植物。伴随着其在原生寄主和次生寄主之间转移, 有性生殖和孤雌生殖交替进行(Wool 1984)。该亚科内大部分种类都能在其原生寄主植物上形成虫瘿, 不同种蚜虫所形成的虫瘿在形态、大小、位置、结构等方面均彼此不同(张合彩等, 2006)。Inbar等(2004)基于线粒体基因 CO I /COII 序列构建了五节根蚜亚科的系统发育树。但是由于取样的偏向, 其所选样品并未涉及东亚特有的倍蚜类。

五节根蚜亚科内族的划分一直存在争议, 一种观点认为五节根蚜亚科包括两个族: 五节根蚜族 Fordini 和角瘦绵蚜族 Baizongini (Börner, 1952; Davatchi, 1958); 另一种观点认为应该分为五节根蚜族和倍蚜族 Melaphilini (Blackman & Eastop, 1984; Ghosh, 1984; 张广学等, 1999)。这两种划分方法所依据的原则以及每个族内所包括的成员也都彼此不一样。

在本研究中增加了东亚特有(主要分布在中国)的倍蚜类样品, 通过构建基于线粒体基因 COII 序列的系统发育树并结合蚜虫形态学和生物学特征, 旨在澄清五节根蚜亚科内族的划分问题。No. 16961 号标本采集于漆树科盐肤木上的虫瘿内, 根据其寄主植物及虫瘿形状初步判断隶属于五节根蚜亚科, 但由于标本均为若蚜而无法对其进行形态鉴定。本文尝试采用分子手段对未定名种 No. 16961 号标本进行分子

收稿日期: 2008-04-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30570214, 30670240), 河南省动物学省级重点学科建设项目(编号: 豫教材[2001]160), 河南师范大学新引进博士科研启动经费项目(编号: 0713)

作者简介: 张合彩(1977~), 女, 博士, 讲师, 主要从事分子系统学及进化研究, E-mail: zhca0339@sina.com

* 通讯作者 Corresponding author E-mail: qiaog@bz.ac.cn

致谢: 中国林科院资源昆虫所杨子祥博士、中国科学院动物研究所黄晓磊博士帮助采集蚜虫标本, 在此深表谢忱!

鉴定。

1 材料与方法

1.1 样品的选择

选取 2004~2005 年采自中国和以色列的 11 种(亚种)五节根蚜亚科蚜虫及一号未定名种为内群。选取五节根蚜亚科的姐妹群——瘦绵蚜亚科 Pemphiginae 的 2 个种为外群。所选样品的相关信息见表 1。凭证标本浸泡于 75% 酒精中,保存于中国科学院动物研究所标本馆(中国,北京)。

1.2 DNA 提取、PCR 扩增及序列测定

选用线粒体细胞色素 C 氧化酶 II 亚基基因 COII 为分子标记,所用 PCR 引物为:正向引物 2993-Stern 5'-CAT TCA TAT TCA GAA TTA CC-3',反向引物 3772-Normark 5'-GAG ACC ATT ACT TGC TTT CAG TCA TCT-3'。其扩增体系为 50 μ l 包括 1 \times PCR Buffer 1.25 U Taq DNA 聚合酶、200 μ M dNTPs (均购自大连宝生物工程有限公司)、0.2 μ M 引物(上海生工生物工程技术有限公司合成)、DNA 模板 2 μ l。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,49~51 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。PCR 反应在 GeneAmp PCR System 9700(Applied Biosystem, USA)上进行。

PCR 产物经电泳检测后,送北京英骏生物技术有限公司进行纯化和测序。测序反应用相应的扩增引物,在 ABI3730 型自动测序仪(Applied Biosystem, USA)上进行。

1.3 序列拼接和比对

所得序列通过 DNASTar 5.0(DNASTAR, Inc. USA)进行双向测序结果的拼接、校对。运用 ClustalX 1.81(Thompson et al, 1997)进行多重序列比对。使用 Mega 2.0(Kumar et al, 2001)分析序列变异情况及序列间 p 距离。

1.4 系统发育分析

应用 PAUP* 4.0b(Swofford, 2002)、Modeltest 3.06(Posada & Crandall, 1998)、MrBayes 3.0(Huelsenbeck et al, 2001)

等软件,使用最大简约法(maximum parsimony MP)、最大似然法(maximum likelihood ML)和贝叶斯分析(Bayesian analysis)分别构建五节根蚜亚科的分子系统发育树。

1.5 蚜虫典型形态特征及寄主植物信息在系统树上的对应
将蚜虫的典型形态学特征、寄主植物信息对应到系统发育树相应的物种以探讨该亚科内两族的划分。

2 结果

2.1 数据集

共测得 COII 序列 8 条(2 个外群序列和 6 个内群序列),另外 6 个内群样品的 COII 序列从 GenBank 下载(序列登录号见表 1)。经 Seqman 比对截齐后得到 546 bp 的 COII 片段用于系统发育分析。在这 546 个碱基位点中,保守位点 386 个,可变位点 160 个,简约信息位点 119 个(对于 12 条内群序列,保守位点为 409 个,可变位点为 137 个,简约信息位点为 92 个)。碱基平均含量为 T 40.4%, C 12.9%, A 39.2%, G 7.5%。未定名种 No 16961 与肚倍蚜 4 个亚种的平均 p 距离为 0.0035(范围:0.002~0.004),与亚科内其他 8 种的平均 p 距离为 0.1031(范围:0.073~0.117)(表 2)。

2.2 系统发育分析

用 PAUP* 4.0 构建了 MP 树、ML 树,用 MrBayes 构建了贝叶斯树。这 3 棵树的拓扑结构非常相似(图 1)。两个外群北京伪卷叶绵蚜 *Thecabius beijingensis* 和杨柄叶瘦绵蚜 *Pemphigus atsumurai* 位于系统树的基部。12 个内群物种以较高的支持率构成单系(MP 树及 ML 树中自举检验的支持率分别为 99% 和 100%,贝叶斯树中后验概率为 1.00)。系统树明显分为两大分支,分别对应于五节根蚜族和倍蚜族(Heie, 1980; 张广学, 钟铁森, 1983; Blackman & Eastop, 1994),这和我们基于核基因 EF-1 α 和线粒体基因 COI 联合分析所得结果一致(Zhang & Qiao, 2007)。其中乳香平翅根蚜 *A. lentisci*

表 1 本研究所用标本的相关信息
Table 1 Information for species (subspecies) examined in this study

种(亚种)	采集地点	采集日期	原生寄主植物	GenBank 登录号
外群				
北京伪卷叶绵蚜 <i>Thecabius beijingensis</i> Zhang 1995	中国:黑龙江(漠河)	2004-V II-31	<i>Populus</i> sp.	EU636708
杨柄叶瘦绵蚜 <i>Pemphigus atsumurai</i> Monzen 1929	中国:西藏(百巴乡)	2002-V II-1	<i>Populus</i> sp.	EU636706
内群				
肚倍蚜蛋铁亚种 <i>Kaburagi rhusicola ovogallis</i> (Tsei et Tang 1945)	中国:四川(峨嵋山)	2005-V I-16	<i>Rhus potaninii</i>	EU636704
肚倍蚜蛋肚亚种 <i>Kaburagi rhusicola omtirhusicola</i> Xiang 1980	中国:四川(峨嵋山)	2004-V I-27	<i>R. potaninii</i>	EU636703
肚倍蚜指名亚种 <i>Kaburagi rhusicola rhusicola</i> Takagi 1937	中国:四川(峨嵋山)	2004-V I-27	<i>R. potaninii</i>	EU636705
肚倍蚜枣铁亚种 <i>Kaburagi rhusicola ensigallii</i> (Tsai et Tang 1945)	中国:四川(峨嵋山)	2004-V I-27	<i>R. chinensis</i>	EU636702
<i>Fordinae</i> sp. (No 16961)	中国:陕西(宁陕县)	2005-V II-3	漆树科	EU636701
角倍蚜 <i>Schlechtendalia chinensis</i> (Bell 1848)	中国:四川(峨嵋山)	2004-IX-29	<i>R. javanica</i>	EU636707
乳香平翅根蚜 <i>Aploneura lentisci</i> (Passerini 1863)	以色列 Israel O ran in	2005-X-1	<i>Pistacia lentiscus</i>	*
<i>Baizongia pistacia</i> (Linnaeus 1767)	以色列 Israel O ran in	2005-X-1	<i>P. palaestina</i>	*
<i>Slavum wertheimae</i> Hiller & Lansberg 1957	以色列 Israel O ran in	2005-X-1	<i>P. atlantica</i>	*
<i>Geoia wertheimae</i> Brown & Blackman 1994	以色列 Israel O ran in	2005-X-1	<i>P. palaestina</i>	*
缘五节根蚜 <i>Fordia arginata</i> Koch, 1857	以色列 Israel O ran in	2005-X-1	<i>P. palaestina</i>	*
蚁五节根蚜 <i>Fordia formicaria</i> von Heyden 1837	以色列 Israel O ran in	2005-X-1	<i>P. palaestina</i>	*

* 下载序列

表 2 COII 序列间的 p-距离

Table 2 Pairwise distances between taxa in analysis expressed as a proportion of nucleotide differences (COII) (p-distances)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 <i>Geoica wertheimae</i>														
2 <i>Baizongia pistacia</i>	0.095													
3 <i>Slavum wertheimae</i>	0.103	0.112												
4 <i>Forda marginata</i>	0.128	0.130	0.134											
5 <i>Forda formicaria</i>	0.110	0.097	0.110	0.084										
6 <i>Aploneura lentisci</i>	0.123	0.119	0.112	0.114	0.097									
7 <i>Kaburagia rhusicola rhusicola</i>	0.110	0.108	0.114	0.115	0.097	0.121								
8 <i>Kaburagia rhusicola ovatirhusicola</i>	0.110	0.108	0.114	0.115	0.097	0.121	0.000							
9 <i>Kaburagia rhusicola ensigallis</i>	0.110	0.108	0.114	0.115	0.097	0.121	0.000	0.000						
10 <i>Kaburagia rhusicola ovogallis</i>	0.108	0.106	0.115	0.117	0.095	0.119	0.002	0.002	0.002					
11 <i>Fordinae</i> sp. (No 16961)	0.106	0.104	0.114	0.115	0.093	0.117	0.004	0.004	0.004	0.002				
12 <i>Schlechtendalia chinensis</i>	0.112	0.104	0.099	0.115	0.099	0.115	0.077	0.077	0.077	0.075	0.073			
13 <i>Pemphigus matsumurai</i>	0.156	0.148	0.139	0.136	0.136	0.134	0.123	0.123	0.123	0.125	0.123	0.117		
14 <i>Thecabius beijingensis</i>	0.150	0.145	0.143	0.152	0.136	0.137	0.134	0.134	0.134	0.132	0.130	0.117	0.079	

注: 未鉴定种 No 16961和肚倍蚜的 4个亚种之间的 p-距离用粗体表示, 以示强调

Note: The distances between No 16961 and four subspecies of *Kaburagia rhusicola* are given in bold for emphasis

缘五节根蚜 *F. marginata*、蚁五节根蚜 *F. formicaria*、*S. wertheimae*、*G. wertheimae*、*B. pistacia*聚为一支, 对应于五节根蚜族 *Fordinae*角倍蚜 *S. chinensis* 肚倍蚜蛋铁亚种 *K. r. ovogallis* 肚倍蚜指名亚种 *K. r. rhusicola* 肚倍蚜蛋肚亚种 *K. r. ovatirhusicola* 肚倍蚜枣铁亚种 *K. r. ensigallis* 以及一未定名种 No 16961聚为一支, 对应于倍蚜族 *Melaphidini* 其中未定名种 No 16961在 3棵树中均以 100% 的支持率和肚倍蚜的 4个亚种聚为一支。

在对黄连木上的结痂蚜虫的生物学和多态性进行比较描述之后, 指出仅依据原生感觉圈有无睫来对五节根蚜亚科进行族的划分可能会导致混乱, 因为角痂蚜族内的一些种, 其原生感觉圈可能缺失或不明显, 例如根蚜属 *Geoica* 某些种的有翅迁移蚜。Ghosh (1984)认为五节根蚜亚科是一个族, 即五节根蚜族。该族包括两个亚族: 五节根蚜亚族 *Fordinae*和倍蚜亚族 *Melaphidina* 五节根蚜亚族以黄连木为原生寄主, 以禾本科根部以及其他植物为次生寄主; 倍蚜亚族以盐肤木为原生寄主, 以蕨类和其他被子植物为次生寄主。

在基于不同算法(最大简约法和最大似然法)所构建的系统树中(图 1), 五节根蚜亚科以较高的支持率构成单系。该单系群明显分为两大分支, 上面一支对应倍蚜族, 下面一支对应于五节根蚜族。将蚜虫的一些主要鉴别特征对应到分子系统树上(图 2), 结果发现: 倍蚜族支的蜡片均较发达, 于背部排列成 4 或 6 列; 而在五节根蚜族支, 大多数种类没有蜡片。即使 *A. lentisci* 有 6 列蜡片, *B. pistacia* 有 4 列, 它们的蜡腺细胞和蜡片都非常小。对于感觉圈, 五节根蚜族均具有圆形、卵圆形或长条形的原生感觉圈; 而在倍蚜族, 其原生感觉圈小或无, 但是该族蚜虫的触角节 III ~ V 都有大的片状次生感觉圈。另外一个重要的形态特征是无翅孤雌蚜的附节节数, 五节根蚜族的附节均为 2 节, 而倍蚜族都是 1 节。这些重要形态特征在分子系统树上的分布格局也提示五节根蚜亚科应分为五节根蚜族和倍蚜族两个族。

原生寄主植物在分子系统树上的映射情况提示了该亚科蚜虫有极强的原生寄主专一性(图 2)。上面一支(倍蚜族)均在盐肤木属植物上寄生, 而下面一支(五节根蚜族)均以黄连木属植物为原生寄主。五节根蚜亚科蚜虫强烈的寄主专一性表明原生寄主类型是该亚科内两族划分的一个重要特征。

3.2 未定名种 No 16961为肚倍蚜 *Kaburagia rhusicola*

利用一段特定的 DNA 序列来识别和鉴定物种, 即 DNA 分类(DNA taxonomy)。当前 DNA 分类主要用于采用传统数

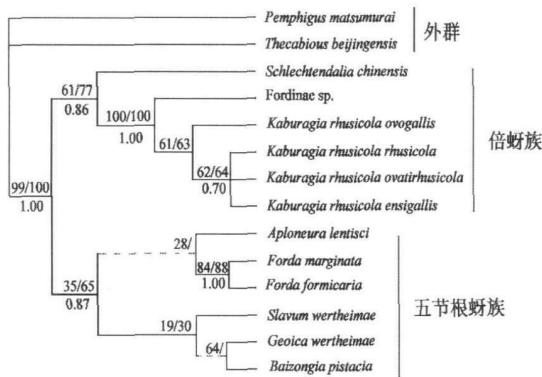


图 1 基于线粒体基因 COII 序列所构建的五节根蚜亚科的 MP、ML 和贝叶斯树, 虚线表示不一致的分支。MP、ML 自举检验的支持率标注在分支上方, 贝叶斯分析的后验概率标注在分支下方 (MP 树: 一致性指数 CI=0.618902 保留指数 RI=0.592834, 校正一致性指数 RC=0.366906 树长=328 ML 树: 最适模型 GTR+I+G, I=0.5327, G=0.4762 似然率 -lnL=2030.7366)

3 讨论

3.1 五节根蚜亚科内族的划分

五节根蚜亚科内族的划分一直是一个颇有争议的问题。Bömer (1952)认为根据背部毛的排列方式、次生感觉圈的形状、与漆树科植物之间的密切关系等, 该亚科应分为五节根蚜族 *Fordinae*和角痂蚜族 *Baizongini* 其中五节根蚜族原生感觉圈无睫, 角痂蚜族原生感觉圈有睫。Davatchi (1958)

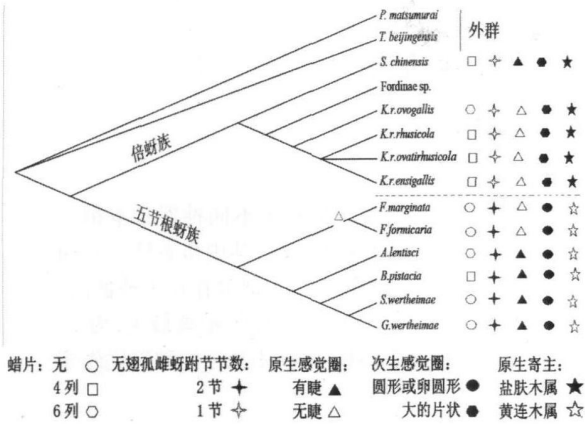


图 2 蚜虫主要形态特征及其原生寄主植物在系统树上的对应

据,如形态数据难以辨别的物种识别,以及用于幼体识别 (Paquin & Hedin, 2004; Miller *et al.*, 2005)。另外 DNA 序列数据可用于有效对应某些两性形态迥异物种的雌雄个体,如榕小蜂 (姜自锋, 2005), 社会性昆虫的不同级 castes 蚜虫的原生寄主型和次生寄主型 (Stern *et al.*, 1997)。16961号标本采自漆树科盐肤木上的虫瘿内,根据其寄主植物可初步断定该标本为倍蚜类,但由于采时虫瘿尚未成熟,虫体均为若蚜,无法对其进行有效的形态鉴定。用不同构树方法所构建的 3 棵基于 COII 序列的分子系统树 (MP 树、ML 树和贝叶斯树),未定名种 No. 16961 均以 100% 的支持率和肚倍蚜的 4 个亚种聚为一支。遗传距离计算结果表明 No. 16961 和肚倍蚜的 4 个亚种之间的平均 p 距离为 0.0035, 浮动范围为 0.002 ~ 0.024 而它和其他内群之间的平均 p 距离为 0.1031, 浮动范围为 0.073 ~ 0.117。前者明显小于后者,由此推测 No. 16961 号标本很可能是肚倍蚜,但究竟是哪一个亚种尚有待进一步研究。

4 参考文献

姜自锋. 2005 榕小蜂分子系统学研究 [D]. 中国科学院动物研究所博士学位论文.
 张广学, 乔格侠, 钟铁森, 等. 1999 中国动物志 昆虫纲 第十四卷 同翅目: 蚜科 瘿绵蚜科 [M]. 北京: 科学出版社: 1~ 356
 张广学, 钟铁森. 1983. 中国经济昆虫志 [M]. 北京: 科学出版社: 1~ 387.
 张合彩, 乔格侠, 张广学. 2006 瘿绵蚜科虫瘿的多样性研究 [J]. 动物分类学报, 31: 48~ 54
 Blackman RL, Eastop VF. 1994. Aphids on the World's Trees: An identification and information guide [M]. Wallingford: CAB International 1~ 904.

Bömer C. 1952. Europe Centralis Aphiles [J]. Mitteilungen der Thüringischen Botanischen Gesellschaft 4 (3): 1~ 488.
 Davatchi AG. 1958. Etude biologique de la faune entomologique des Pistacia sauvages et cu lèves [J]. Revue de Pathologie Vegetale et d'Entomologie Agricole de France, 37: 1~ 166
 Ghosh AK. 1984. Fauna of India Homoptera Aphidoidea Subfamily Pemphiginae [M]. Calcutta: Zoological Survey of India 1~ 429
 Heie OE. 1980. The Aphidoidea of Fennoscandia and Denmark. I [J]. Fauna Entomologica Scandinavica 9: 1~ 236
 Huelsenbeck JP, Ronquist F, Nielsen R, *et al.* 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology [J]. Science, 294: 2310~ 2314.
 Inbar M, Wink M, WoolD. 2004. The evolution of host plant manipulation by insects: molecular and ecological evidence from gall forming aphids on *Pistacia* [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution 32: 504~ 511
 Kumar S, Tamura K, Jakobsen I *et al.* 2001. MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software [J]. Bioinformatics 17: 1244~ 1245
 Miller KB, Akerly Y, Wolfe W, *et al.* 2005. Association of insect life stages using DNA sequences: the larvae of *Philodotus umbrinus* (Motschulsky) (Coleoptera: Dytiscidae) [J]. Systematic Entomology 30: 499~ 509
 Paquin P, Hedin, M. 2004. The power and perils of 'molecular taxonomy': a case study of eyeless and endangered *Cicurina* (Aneura: Dictynidae) from Texas caves [J]. Molecular Ecology, 13: 3239~ 3255
 Posada D, Crandall KA. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution [J]. Bioinformatics 14: 817~ 818.
 Stern DL, Aoki S, Kurosu U. 1997. Determining aphid taxonomic affinities and life cycles with molecular data: a case study of the tribe Ceratophidini (Homoptera: Aphidoidea: Hemiptera) [J]. Systematic Entomology, 22: 81~ 96
 Swofford DL. 2002. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods), version 4 [M]. Sunderland MA, Sinauer Associates
 Thompson J, Gibson T, Plewniak F, *et al.* 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acid Research, 25: 4876~ 4882
 WoolD. 1984. Gall forming aphids [A]. In Ananthakrishnan TN (Ed.) Biology of Gall Insects [C]. New Delhi: Oxford and IBH: 11~ 58
 Zhang HC, Qiao GX. 2007. Molecular phylogeny of Fordini (Homoptera: Aphididae: Pemphiginae) inferred from nuclear gene EF-1 α and mitochondrial gene COI [J]. Bulletin of Entomological Research 97: 379~ 386