

小片蝽线粒体基因组及蝽科系统发育分析

刘迎香, 赵清

(山西农业大学 植物保护学院, 山西 太谷 030801)

摘要: 为了从线粒体基因组水平探讨小片蝽 *Sciocoris lateralis* 在蝽科中的分类地位, 丰富蝽科线粒体基因组基本数据, 为蝽科系统发育进化研究提供一定的理论依据, 通过高通量测序, 首次测定并分析了小片蝽完整线粒体基因组 (Genbank 登录号: OP531920), 提取蝽科物种的 13 个蛋白编码串联序列 (PCGs), 使用最大似然法、贝叶斯法构建系统发育树。结果显示, 小片蝽昆虫的线粒体全基因组长度为 15 445 bp, 包括 13 个蛋白编码基因 (Protein-coding genes, PCGs)、2 个 rRNA 基因 (ribosome RNAs, rRNAs)、22 个 tRNA 基因 (transfer RNAs, tRNAs) 和 1 个控制区 (Control region)。小片蝽线粒体基因组结构排序与其他蝽科物种一致, 均无基因重排现象。小片蝽线粒体全序列 AT 含量为 74.26%, GC 含量为 25.74%。13 个蛋白编码基因中, *cox1*、*nad1* 和 *nad6* 的起始密码子为 TTG, 其余 10 个蛋白编码基因的起始密码子是 ATT、ATA、ATG。在所测得的 tRNA 基因中, *trnS1* 和 *trnV* 缺失 DHU 臂, 其他 20 个 tRNA 均能折叠形成典型的三叶草结构。基因错配方式主要为 G-U 错配。基于 13 个 PCGs 构建的蝽科系统发育树结果显示, 小片蝽与斑须蝽的亲缘关系最近并且位于蝽亚科分支, 支持二星蝽族 Eysarcorini 和 Strachiini 族的单系性, 而棕蝽族 Caystrini 和腹沟族 Halyini 互为姐妹群, 这与传统形态学分类结果一致; 益蝽亚科与蝽亚科曼蝽属 (*Menida*) 形成姐妹群关系, 该系统发育关系与传统形态学分类学研究结果不一致。

关键词: 小片蝽; 线粒体基因组; 蝽科; 系统发育

中图分类号: Q969.35⁺1.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-2481(2024)02-0078-11

Mitochondrial Genome of *Sciocoris lateralis* and Phylogenetic Analysis of Pentatomidae

LIU Yingxiang, ZHAO Qing

(College of Plant Protection, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: In order to explore the taxonomic position of *Sciocoris lateralis* in the family Pentatomidae at the mitochondrial genome level, enrich the basic mitochondrial genome data of the family Pentatomidae, and provide a theoretical basis for the phylogenetic evolution of Pentatominae, in this study, the complete mitochondrial genome of *S. lateralis* was determined and analyzed for the first time through high-throughput sequencing (Genbank login Number: OP531920). 13 protein-coding tandem sequences (PCGs) from species of Pentatomidae were extracted and phylogenetic trees were constructed using the maximum likelihood method and Bayesian method. The results showed that the mitochondrial genome length of the insects was 15 445 bp, including 13 Protein-coding genes (PCGs), 2 rRNA genes (ribosomal RNAs), 22 tRNA genes (transfer RNAs), and a control region. The sequence of the mitochondrial genome was consistent with that of other species, and there was no gene rearrangement. The content of AT and GC was 74.26% and 25.74%, respectively. Among the 13 protein-coding genes, the start codons of *cox1*, *nad1*, and *nad6* were TTG, while the start codons of the other 10 protein-coding genes were ATT, ATA, and ATG. Among the measured tRNA genes, *trnS1* and *trnV* were missing DHU arms, while the other 20 tRNAs were able to fold to form a typical clover structure. The main pattern of gene mismatch was G-U mismatch. Based on the 13 PCGs, the phylogenetic tree of Pentatomidae showed that *S. lateralis* and *Dolycoris baccarum* were closely related and located in the subfamily of Pentatominae, supporting the monophyletic families of Eysarcorini and Strachiini, while Caystrini and Halyini were sister groups. This was consistent with the traditional morphological classification. Asopininae and *Menida* were sister groups, the phylogenetic relationship was inconsistent with the conclusion of traditional morphological taxonomy.

Key words: *Sciocoris lateralis*; mitochondrial genome; Pentatomidae; phylogeny

蝽科 Pentatomidae 由 Leach 于 1815 年建立, 是 蝽总科 Pentatomoidea 中种群数量最大的科, 世界

收稿日期: 2023-05-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31872272); 山西省回国留学人员科研资助项目 (2020-064, 2020-065)

作者简介: 刘迎香 (1997-), 女, 贵州雷山人, 在读硕士, 研究方向: 蝽科昆虫系统进化。

通信作者: 赵清 (1985-), 女, 山东临沂人, 教授, 博士, 主要从事昆虫分类、昆虫系统发育与进化研究工作。

分布10亚科近5000种。蝽科物种大部分为植食性昆虫,以刺吸式口器吸食蔬菜、果树和森林等幼枝嫩叶汁液,是重要的农业害虫,例如,稻绿蝽 *Nezara viridula* 危害水稻、赤条蝽 *Graphosoma rubrolineatum* 危害伞形花科植物,此外,有部分是捕食性昆虫,蝾蝽 *Arma custos* 捕食鳞翅目、鞘翅目幼虫等害虫,是生物防治的利用对象^[1]。小片蝽 *Sciocoris lateralis* Fieber, 1851 隶属于半翅目 Hemiptera 蝽科 Pentatomidae 蝽亚科 Pentatominae 片蝽属。该属昆虫多分布于热带地区,国内外对该属的记录也多为形态特征描述。小片蝽虫体较小且体色较暗;前胸背板前侧缘具一显著的黄白色宽带,向后不甚达侧角外缘;小盾片长宽约相等,端部宽阔圆钝,基角凹陷明显,各胸节腹板黑色,中、后胸腹板凹槽状;足黄褐色。小片蝽以成虫形态刺吸植物汁液,主要危害油蒿、奇楠沉香等药用植物^[2-3],主要分布于我国广东、海南、云南等地^[4]。

蝽科昆虫线粒体基因 DNA (Mitochondria DNA, mtDNA) 是双链闭合的环状分子,长度在13~16 kb, mtDNA 包含13个蛋白质编码基因 (Protein-coding genes, PCGs), 22个转运 RNA 基因 (Transfer RNAs, tRNAs) 2个核糖体 RNA 基因 (Ribosome RNAs, rRNAs), 以及一个控制区 (Control region), mtDNA 被广泛用于物种的鉴定、种群遗传进化和系统发育树构建的研究中^[5-6]。截至2022年8月,NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 公布的半翅目蝽科昆虫线粒体完整基因组序列有49个,而关于片蝽属的昆虫线粒体完整基因组未见报道。

本研究测定小片蝽线粒体基因组,首次详细分析该物种线粒体基因组结构,绘制了RNA二级结构图,并结合NCBI数据库已报道的49个蝽科PCGs串联序列,构建蝽科系统发育树,从线粒体基因组水平探讨片蝽属在蝽科中的分类地位,旨在探讨蝽科4亚科以及部分族间的系统发育关系。

1 材料和方法

1.1 标本采集及DNA提取、测序

本试验的昆虫标本小片蝽于2021年7月28日采集自中国海南省海口市白沙门公园(20°07'13"N, 110°33'53"E),标本采集后放入装有无水乙醇溶液的冻存管中,带回实验室后置于-20℃冰箱中保存,证据标本(SXAU2-98)目前保存在山西农业大学植物保护学院昆虫分类研究所中。

总DNA提取自小片蝽标本的胸部肌肉,严格按照试剂盒(TaKaRa Clontech DNA)使用手册进行DNA提取,检验合格后,送至公司进行高通量测序(百迈克生物技术),使用全基因组鸟枪法(Whole Genome Shotgun, WGS)策略,构建不同插入片段的文库,利用第2代测序技术(NextGeneration Sequencing, NGS),基于Illumina NovaSeq 6000测序平台,对其进行双末端(Paired-end, PE150)测序,测序大小为27 361 506 bp。

1.2 序列组装、注释与分析

使用fastp (version 0.20.0, <https://github.com/OpenGene/fastp>) 软件对原始数据进行过滤,过滤标准为:截除Reads中的测序接头以及引物序列;过滤掉平均质量值小于Q5的reads;过滤掉N含量大于5的Reads。经过上述一系列的质量控制之后得到的高质量Reads,称之为Clean Data,得到Clean Reads数为27 073 068。

利用Geneious v. 11.0.5^[7]软件进行序列的组装、注释。注释完毕后,打开MITOS Web网页(<http://mitos.bioinf.uni-leipzig.de/>),将参数设置遗传密码(Genetic code)选择无脊椎动物(05-Invertebrate),然后上传序列,该网页可以预测22个tRNAs的位置和二级结构。rRNAs基因边界通过人工查验与已知蝽科的RNA基因比较来确定,控制区的位置由相邻基因的边界来确定。使用MEGA v.11.0分析其碱基组成和密码子使用情况(RSCU)。AT偏斜(AT-skew)和GC偏斜(GC-skew)的计算方法如下。

$$AT-skew = (A - T) / (A + T) \quad (1)$$

$$GC-skew = (G - C) / (G + C) \quad (2)$$

使用DnaSP v.6.12.03^[8]计算蝽科每个PCG的每个非同义位点的非同义替换数(Ka)和每个同义位点的非同义替换数(Ks),不包括终止密码子。将组装注释完整的小片蝽的线粒体全基因组序列,上传至NCBI GenBank数据库,登录号为OP531920。

1.3 系统发育树的构建

本研究从NCBI数据库中下载50种蝽科(含本研究测定的小片蝽)的昆虫线粒体全基因组序列(表1),以盾蝽科的角盾蝽 *Cantao ocellatus* 和紫蓝丽盾蝽 *Chrysocoris stollii* 等2个物种作为外群。基于贝叶斯法(Bayesian, BI)和最大似然法(Maximum-Likelihood, ML)构建系统发育树^[9]。其中,最大似然法构建的系统发育树在PhyloSuite_1.2.2软件中运行,由系统自动筛选最佳分区,分支置信度采用

超快自展法(Ultrafast bootstrapping)重复 100 000 次 知,当分割频率的标准差低于 0.01 时,该程序将停
计算所得。贝叶斯树根据文献[10]中运行计算得 止运行。

表 1 本研究蝽科物种线粒体基因组信息
Tab.1 The mitochondrial genome information of Pentatomidae species in the study

科 Family	亚科 Subfamily	物种 Species	登录号 GenBank number
蝽科 Pentatomidae	蝽亚科 Pentatominae	<i>Anaxilais musgravei</i>	MW679031
		珀蝽 <i>Plautia crossota</i>	NC057080
		<i>Plautia fimbriata</i>	NC042813
		庐山珀蝽 <i>Plautia lushanica</i>	NC058973
		茶翅蝽 <i>Halyomorpha halys</i>	NC013272
		斑须蝽 <i>Dolycoris baccarum</i>	NC020373
		始蝽 <i>Catacanthus incarnatus</i>	NC042804
		棕榈蝽 <i>Caystrus obscurus</i>	NC042805
		卵圆蝽 <i>Hippotiscus dorsalis</i>	NC058969
		凹肩辉蝽 <i>Carbula sinica</i>	NC037741
		北二星蝽 <i>Eysarcoris aeneus</i>	MK841489
		拟二星蝽 <i>Eysarcoris annamita</i>	MW852483
		黑斑二星蝽 <i>Eysarcoris gibbosus</i>	MW846868
		二星蝽 <i>Eysarcoris guttigerus</i>	NC047222
		锚纹二星蝽 <i>Eysarcoris montivagus</i>	MW846867
		红角二星蝽 <i>Eysarcoris rosaceus</i>	MT165687
		中华岱蝽 <i>Dalpada cinctipes</i>	NC058967
		麻皮蝽 <i>Erthesina fullo</i>	NC042202
		叉角玉蝽 <i>Hoplistodera incisa</i>	NC042799
		小片蝽 <i>Sciocoris lateralis</i>	OP531920
		紫蓝曼蝽 <i>Menida violacea</i>	NC042818
		青蝽 <i>Glaucias dorsalis</i>	NC058968
		稻绿蝽 <i>Nezara viridula</i>	NC011755
		宽碧蝽 <i>Palomena viridissima</i>	NC050166
		秀蝽 <i>Neojurtina typica</i>	NC058971
		金绿真蝽 <i>Pentatoma metallifera</i>	NC058972
		红足真蝽 <i>Pentatoma rufipes</i>	MT861131
		真蝽 <i>Pentatoma semiannulata</i>	NC053653
		斑莽蝽 <i>Placosternum urus</i>	NC042812
		<i>Tholosanus proximus</i>	NC063300
		薄蝽 <i>Brachymna tenuis</i>	NC042802
		菜蝽 <i>Eurydema dominulus</i>	NC044762
		横纹菜蝽 <i>Eurydema gebleri</i>	NC027489
		印缅菜蝽 <i>Eurydema liturifera</i>	NC044763
		新疆菜蝽 <i>Eurydema maracandica</i>	NC037042
		蓝菜蝽 <i>Eurydema oleracea</i>	NC044764
		圆角菜蝽 <i>Eurydema ventralis</i>	MG584837
		秦岭菜蝽 <i>Eurydema qinlingensis</i>	NC044765
	益蝽亚科 Asopinae	蝟蝽 <i>Arma custos</i>	NC051562
		峰疣蝽 <i>Cazira horvathi</i>	NC042817
		奥喙蝽 <i>Dinorhynchus dybowskyi</i>	NC037724
		黑曙厉蝽 <i>Eocanthecona thomsoni</i>	NC042816
		黑益蝽 <i>Picromerus griseus</i>	NC036418
		益蝽 <i>Picromerus lewisi</i>	NC058610

续表1 本研究蝽科物种线粒体基因组信息
Tab.1(Continued) The mitochondrial genome information of Pentatomidae species in the study

科 Family	亚科 Subfamily	物种 Species	登录号 GenBank number
蝽科 Pentatomidae	益蝽亚科 Asopinae	蓝蝽 <i>Zicrona caerulea</i>	NC058303
	短喙蝽亚科 Phyllocephalinae	谷蝽 <i>Gonopsis affinis</i>	NC036745
		<i>Dalsira scabrata</i>	NC037374
	舌蝽亚科 Podopinae	赤条蝽 <i>Graphosoma rubrolineatum</i>	NC033875
		稻黑蝽 <i>Scotinophara lurida</i>	NC042815
<i>Deroploa parva</i>		NC063299	
盾蝽科 Scutelleridae	外群1	角盾蝽 <i>Cantao ocellatus</i>	NC042803
	外群2	紫蓝丽盾蝽 <i>Chrysocoris stollii</i>	NC051942

2 结果与分析

2.1 线粒体基因组结构特征

小片蝽的线粒体全基因组序列长度为15 445 bp (图1), 共有37个基因, 包括2个rRNAs、22个tRNAs和13个PCGs, 以及1个控制区。分析线粒体基因组结构发现, 小片蝽基因重叠共有7处, 重叠

长度范围在1~8 bp, 基因重叠最长的区域发生在 *trnW*和*trnC*基因之间, 重叠数为8 bp(AAGCTTTA); *atp8*和*atp6*基因重叠为7 bp(ATGATAA), *nad4l*和*nad4*基因的重叠为7 bp(TTATCAT)。最长基因间隔发生在*nad1*和*trnS2*基因之间, 间隔的长度长达24 bp。*rrnS*和*trnI*之间的区域长度为767 bp。

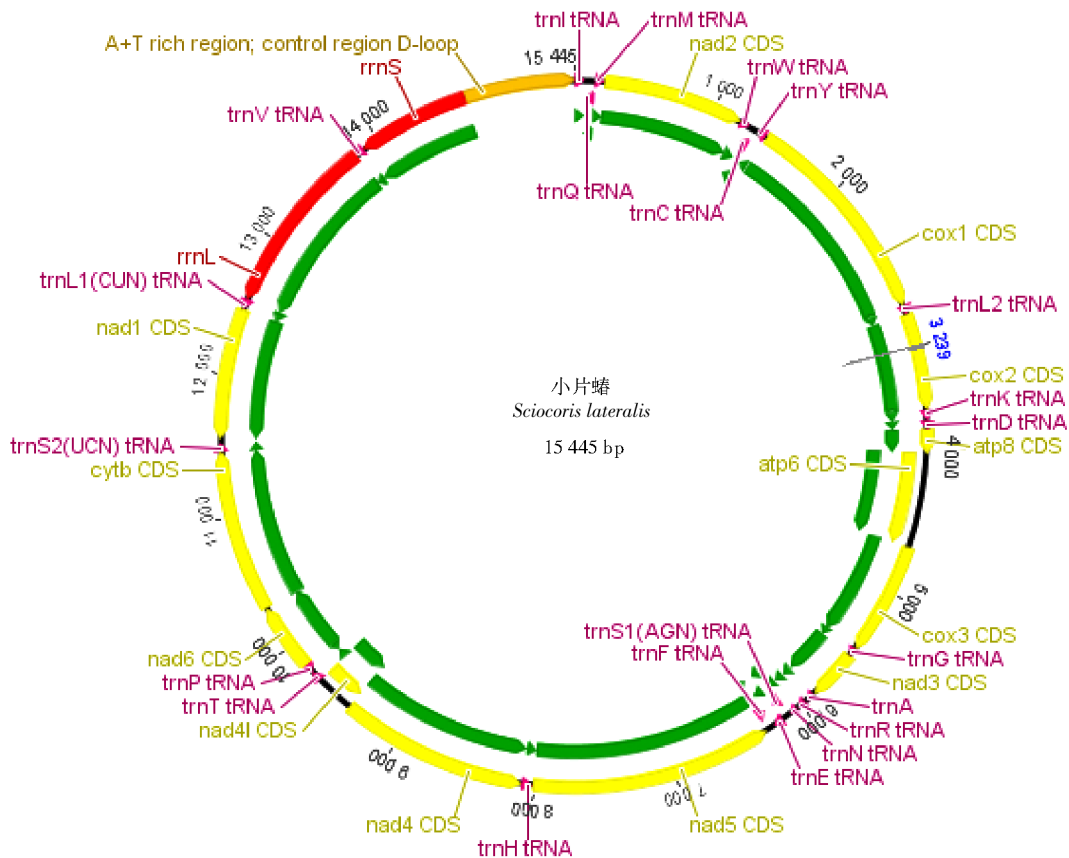


图1 小片蝽线粒体全基因组结构
Fig.1 Complete mitochondrial genome structure of the *Sciocoris lateralis*

2.2 蛋白编码基因(PCGs)

小片蝽13个蛋白编码基因包括 *atp8*、*atp6*、*cox1*、*cox2*、*cox3*、*cytb*、*nad1*、*nad2*、*nad3*、*nad4*、

nad4l、*nad5*、*nad6*。有4个蛋白编码基因(*nad1*、*nad4*、*nad4l*、*nad5*)位于N链(Minor coding strand), 其余9个位于J链(Major coding strand)。*nad5*基因

长度为 1 705 bp,是最长的蛋白编码基因,最短的是 *atp8* 基因,长度仅为 162 bp。ATN 是 *atp8*、*atp6*、*cox2*、*cox3*、*cytb*、*nad2*、*nad3*、*nad4*、*nad4l*、*nad5* 的起始密码子,*cox1*、*nad1* 和 *nad6* 的起始密码子是 TTG;终止密码子均是 TAG 和 TAA,这种完整的三联体密码子终止大部分的蛋白基因编码,也有以

T 或 TA 终止蛋白基因编码(表 2)。大多数蛋白编码基因中的 AT 含量都高于 70%,*atp8* 基因的 AT 碱基含量最高,达 79.63%,AT 碱基含量最低的是 *cox1* 基因,含量为 68.64%。除了 *nad1*、*nad4*、*nad4l*、*nad5* 基因的 AT-skew 值为负值外,其余 9 个基因的 AT-skew 值为正值(表 3)

表 2 小片蟠线粒体全基因组组成
Tab.2 Complete genome composition of the mitochondria of *Sciocoris lateralis*

基因名称 Name	编码链 Strand	位置/bp Position	长度/bp Length	起始密码子 Start codon	终止密码子 Stop codon	反密码子 Anticodon	基因间隔/bp Intergenic nucleotide
<i>trnI</i>	J	1—65	65			GAT	0
<i>trnQ</i>	N	63—131	69			TTG	-3
<i>trnM</i>	J	135—204	70			CAT	3
<i>nad2</i>	J	205—1191	987	ATT	TAA		0
<i>trnW</i>	J	1199—1265	67			TCA	7
<i>trnC</i>	N	1258—1322	65			GCA	-8
<i>trnY</i>	N	1335—1401	67			GTA	12
<i>cox1</i>	J	1404—2940	1 537	TTG	T		2
<i>trnL2</i>	J	2941—3007	67			TAA	0
<i>cox2</i>	J	3008—3688	681	ATA	TAA		0
<i>trnK</i>	J	3690—3761	72			CTT	1
<i>trnD</i>	J	3764—3830	67			GTC	2
<i>atp8</i>	J	3831—3992	162	ATA	TAA		0
<i>atp6</i>	J	3986—4660	675	ATG	TAA		-7
<i>cox3</i>	J	4662—5450	789	ATG	TAA		1
<i>trnG</i>	J	5456—5521	66			TCC	5
<i>nad3</i>	J	5522—5881	360	ATA	TAG		0
<i>trnA</i>	J	5892—5959	68			TGC	10
<i>trnR</i>	J	5962—6026	65			TCG	2
<i>trnN</i>	J	6036—6101	66			GTT	9
<i>trnS1</i>	J	6101—6169	69			GCT	-1
<i>trnE</i>	J	6169—6240	72			TTC	-1
<i>trnF</i>	N	6239—6306	68			GAA	-2
<i>nad5</i>	N	6307—8011	1 705	ATG	T		0
<i>trnH</i>	N	8014—8078	65			GTG	2
<i>nad4</i>	N	8085—9413	1 329	ATG	TAA		6
<i>nad4l</i>	N	9407—9694	288	ATT	TAA		-7
<i>trnT</i>	J	9697—9761	65			TGT	2
<i>trnP</i>	N	9762—9824	63			TGG	0
<i>nad6</i>	J	9827—10309	483	TTG	TAA		2
<i>cytb</i>	J	10315—11454	1 140	ATG	TAA		5
<i>trnS2</i>	J	11458—11526	69			TGA	3
<i>nad1</i>	N	11551—12474	924	TTG	TAA		24
<i>trnL1</i>	N	12475—12539	65			TAG	0
<i>rrnL</i>	N	12540—13813	1 274				0
<i>trnV</i>	N	13814—13881	68			TAC	0
<i>rrnS</i>	N	13882—14678	797				0
Control region	J	14679—15445	767				0

注:基因间隔中,正数表示基因间隔碱基数;负数表示基因重叠碱基数。

Note: In the intergenic nucleotide(bp), the positive number indicated the number of gene spacing bases, and the negative number indicated the number of gene overlapping bases.

表3 小片蟾线粒体基因组核酸组成
Tab.3 Composition of mitochondrial gene nucleic acid of *Sciocoris lateralis*

Gene	T/%	C/%	A/%	G/%	A+T/%	AT-skew	GC-skew	Gene	T/%	C/%	A/%	G/%	A+T/%	AT-skew	GC-skew
<i>atp6</i>	33.19	15.70	39.26	11.85	72.44	0.084	-0.140	<i>nad4</i>	51.69	9.93	24.30	14.07	76.00	-0.360	0.172
<i>atp8</i>	32.72	14.81	46.91	5.56	79.63	0.178	-0.455	<i>nad4l</i>	51.04	8.33	26.04	14.58	77.08	-0.324	0.273
<i>cox1</i>	34.29	16.40	34.35	14.96	68.64	0.001	-0.046	<i>nad5</i>	51.26	9.62	24.75	14.37	76.01	-0.349	0.198
<i>cox2</i>	30.98	16.30	39.50	13.22	70.48	0.121	-0.104	<i>nad6</i>	39.13	11.39	40.58	8.90	79.71	0.018	-0.122
<i>cox3</i>	34.22	16.35	35.23	14.20	69.46	0.015	-0.071	<i>rRNAs</i>	45.00	8.02	31.97	15.02	76.97	-0.169	0.304
<i>cytb</i>	33.86	18.33	35.09	12.72	68.95	0.018	-0.181	<i>tRNAs</i>	37.01	10.83	38.23	13.94	75.24	0.016	0.126
<i>nad1</i>	50.54	9.20	24.13	16.13	74.68	-0.354	0.274	<i>Whole</i>	31.40	14.92	42.86	10.82	74.26	0.154	-0.159
<i>nad2</i>	36.90	9.80	42.90	10.40	79.80	0.075	0.030	<i>Whole-J</i>	35.13	11.81	40.51	12.55	75.63	0.071	0.030
<i>nad3</i>	34.17	15.83	37.78	12.22	71.94	0.050	-0.129	<i>Whole-N</i>	40.38	9.06	34.15	16.42	74.53	-0.084	0.289

根据小片蟾相对密码子使用频率(RSCU)发现,使用频率最高的密码子是NNA(AUA、UUA、CGA等)和NNU(AAU、AUU、UUU);使用频率

最低的是密码子是NNG;而AUC、GUG、CGC、AGG这4个密码子的使用频率为0(图2)。

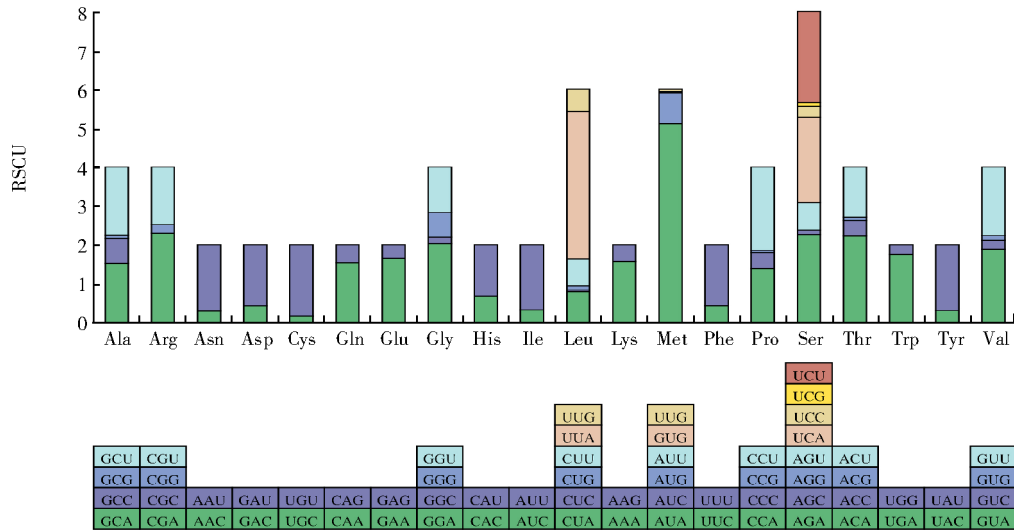


图2 小片蟾线粒体基因组的相对密码子使用率 (RSCU)
Fig.2 The relative synonymous codon usage (RSCU) of mitochondrial genome of *Sciocoris lateralis*

本研究通过计算同义替代率(Ks)、非同义替代率(Ka)和每个PCG的Ka/Ks值,探索蟾科的进化模式,结果显示,蟾科物种13个PCGs的Ka/Ks值均低于1(图3),说明PCGs均处于纯化选择阶段,

因此,本研究选取物种的PCGs都可以用来分析蟾科的系统发育关系。*atp8*的Ka/Ks值最高(0.557),而*cox1*的Ka/Ks值最低(0.082)。

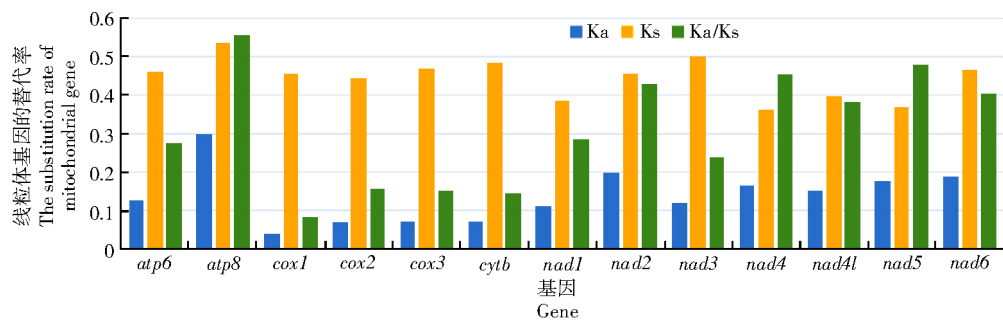


图3 蟾科蛋白质编码基因 (PCGs) 的进化速率
Fig.3 Rate of evolution of protein-coding genes (PCGs) in Pentatomidae

2.3 tRNAs 基因

在小片蜻线粒体基因组 tRNA 总长度 1 478 bp, 14 个 tRNA 基因 (*trnI*、*trnM*、*trnW*、*trnL2*、*trnK*、*trnD*、*trnG*、*trnA*、*trnR*、*trnN*、*trnS1*、*trnE*、*trnT*、*trnS2*) 位于 J 链, 8 个 tRNA 基因 (*trnQ*、*trnC*、*trnY*、*trnF*、*trnH*、*trnP*、*trnL1*、*trnV*) 位于 N 链, 每个 tRNA 基因的长度在 63~73 bp。22 个 tRNA 基因的碱基

含量为 A (38.23%)、T (37.01%)、G (13.94%)、C (10.83%)。在小片蜻 22 个转运 RNA 基因的二级结构中, 基因 *trnS1*(GCT) 和 *trnV*(TAC) 因缺失了 DHU 臂而不能形成典型的二级结构。22 个 tRNAs 二级结构中, 除了典型的碱基配对 (A-U 和 G-C) 外, 还出现 21 对错配, 例如 G-U (图 4)。

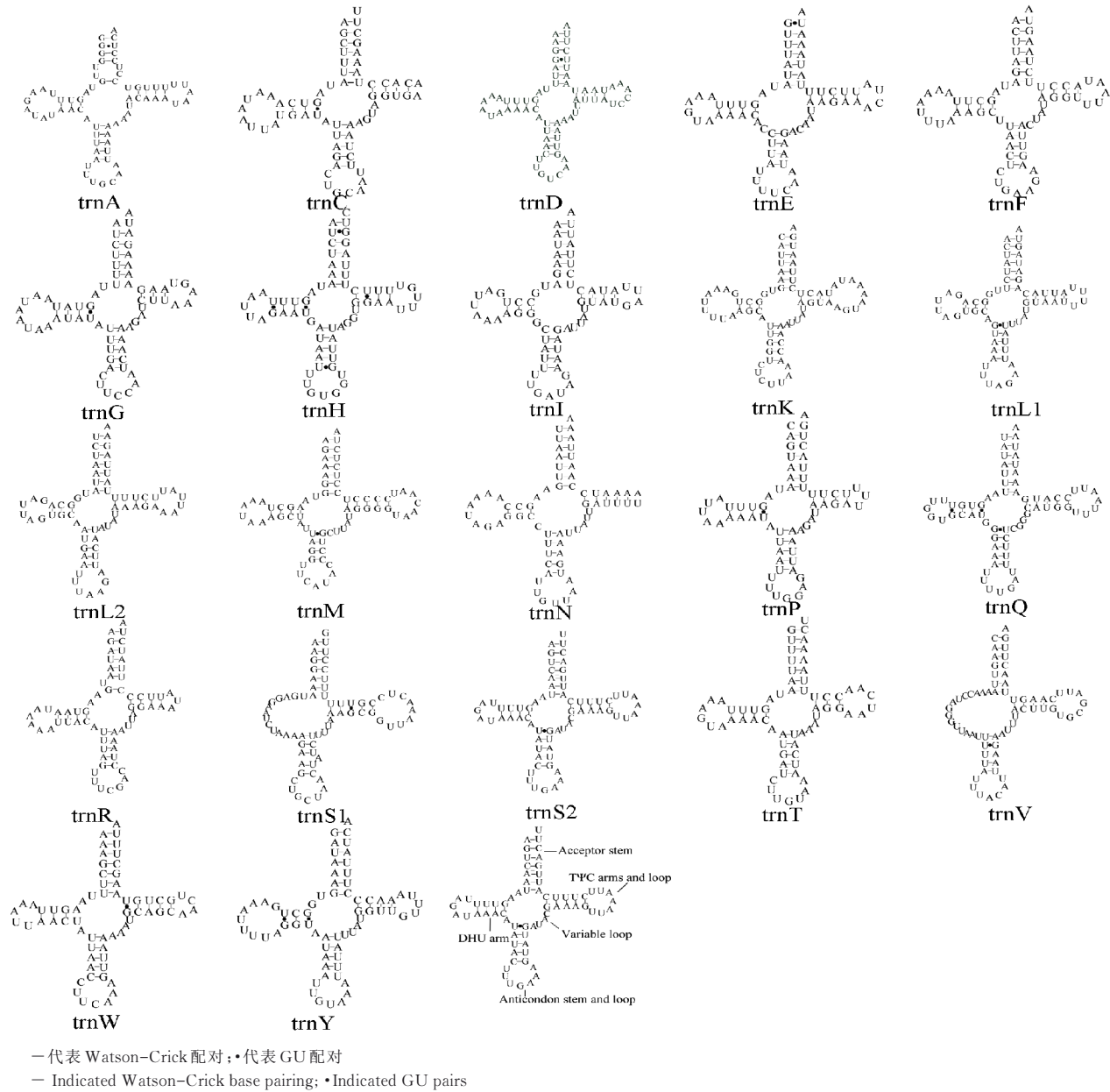


图 4 小片蜻的 tRNAs 的二级结构
Fig.4 Secondary structure of tRNAs of *Sciocoris lateralis*

2.4 rRNAs 基因与控制区

小片蜻线粒体基因中, *rrnL* 基因和 *rrnS* 基因位于 J 链, 碱基含量为 A (31.97%)、T (45.00%)、G (15.02%)、C (8.02%)。 *rrnL* 基因长度为 1 274 bp, 位于 *trnV* 与 *trnL1* 之间, 预测的二级结构包括有

I、II、IV、V、VI 等 5 个结构域, 其中结构域 III 缺失, 同时形成了 44 个茎环结构 (图 5)。 *rrnS* 基因长度为 797 bp, 位于控制区和 *trnV* 之间, 其 5' 末端与控制区相邻, 该二级结构包括 3 个结构域, 由约 26 个茎环结构组成 (图 6)。控制区长度为 767 bp,

介于 *rnrS* 与 *trnI* 基因之间。

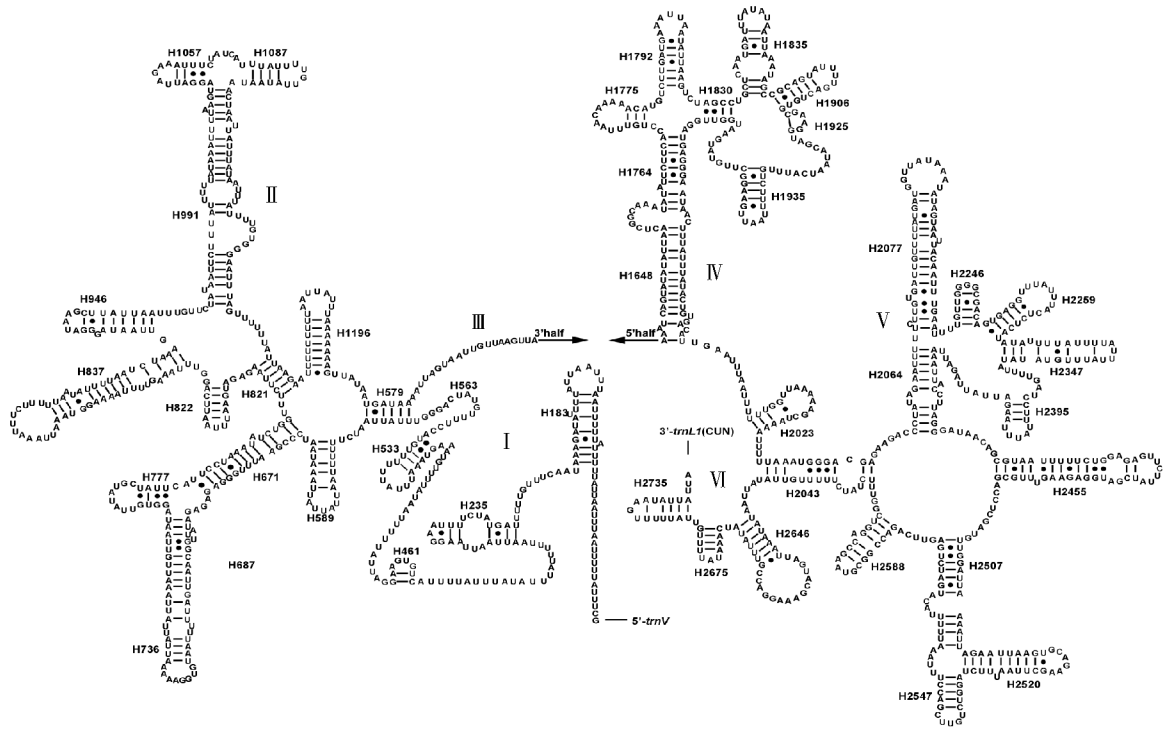


图5 小片蜻线粒体基因组 *rrnL* 二级结构
Fig.5 *rrnL* secondary structure of the mitochondrial genome of the *Sciocoris lateralis*

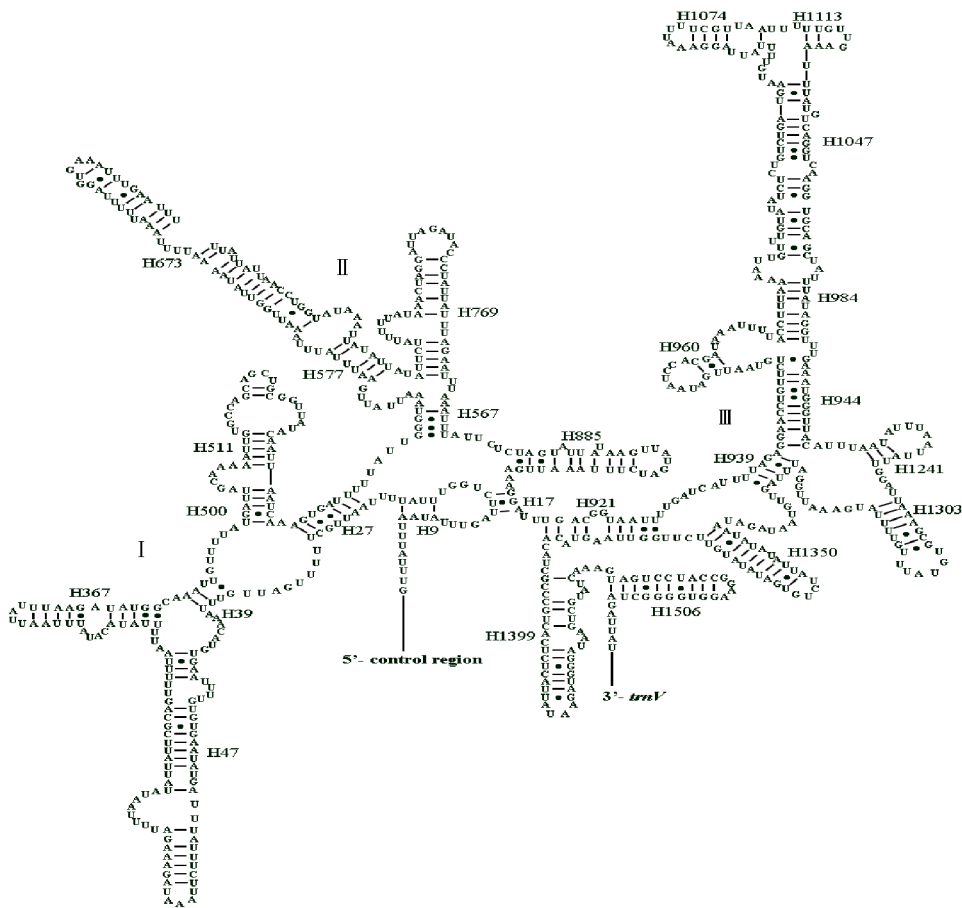


图6 小片蜻线粒体基因组 *rrnS* 二级结构
Fig.6 *rrnS* secondary structure of the mitochondrial genome of the *Sciocoris lateralis*

2.5 系统发育关系

以盾蝽科 2 个物种作为外群、蝽科 4 亚科 50 个物种作为内群,基于 13 个 PCGs 构建的 2 个系统发育树的拓扑结构基本一致。结果显示,小片蝽与斑须蝽 *Dolycoris baccarum* 的亲缘关系更近;支持二星蝽族 Eysarcorini 和 Strachiini 的单系性,棕蝽族 Caystrini 和腹沟族 Halyini 互为姐妹群;益蝽亚科

类群很好地聚为一支,并和蝽亚科部分类群聚类到一起,其拓扑结构为:((蠟蝽属 *Arma*+蓝蝽属 *Zicrona*)+((疣蝽属 *Cazira*+喙蝽属 *Dinorhynchus*)+((曙厉蝽属 *Eocanthecona*+益蝽属 *Picromerus*))),短喙蝽亚科的 2 个属聚在一起,也和蝽亚科部分物种聚为一支,而舌蝽亚科中的 3 个物种并没有聚为一支,不支持其单系性(图 7、8)。

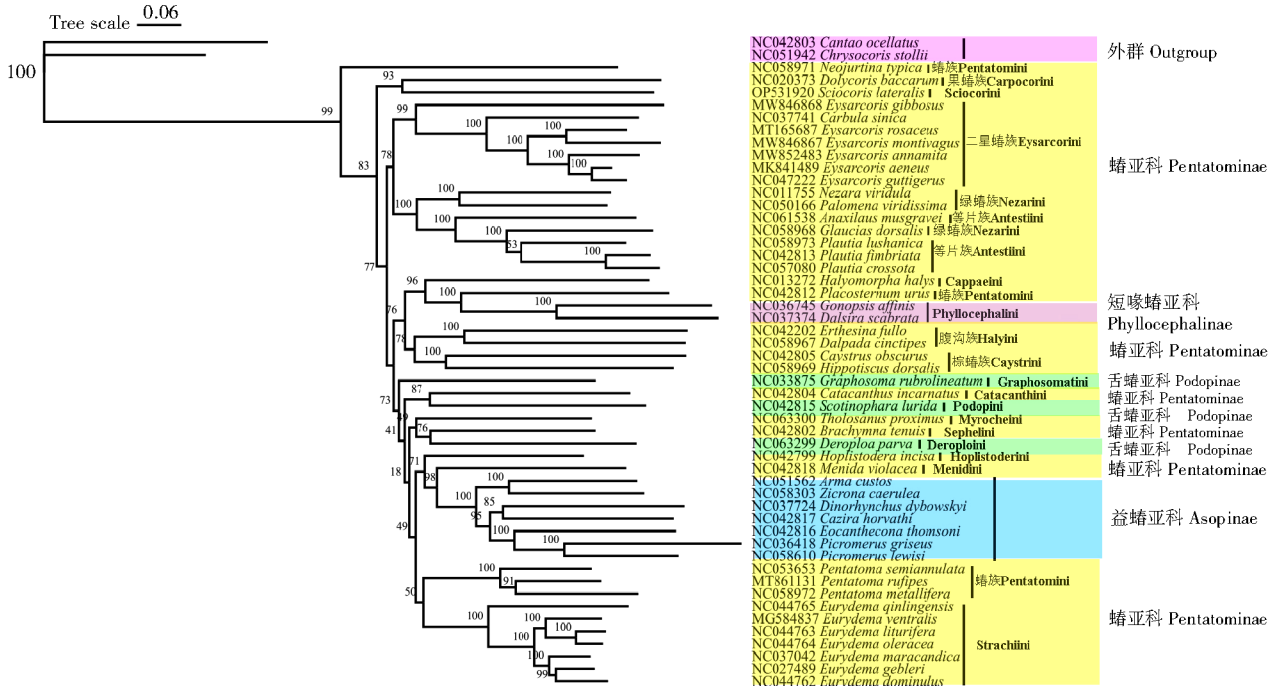


图 7 基于 13 个蛋白编码基因序列构建的最大似然法系统发育树
Fig.7 Maximum likelihood phylogenetic tree based on 13 protein-coding gene sequences

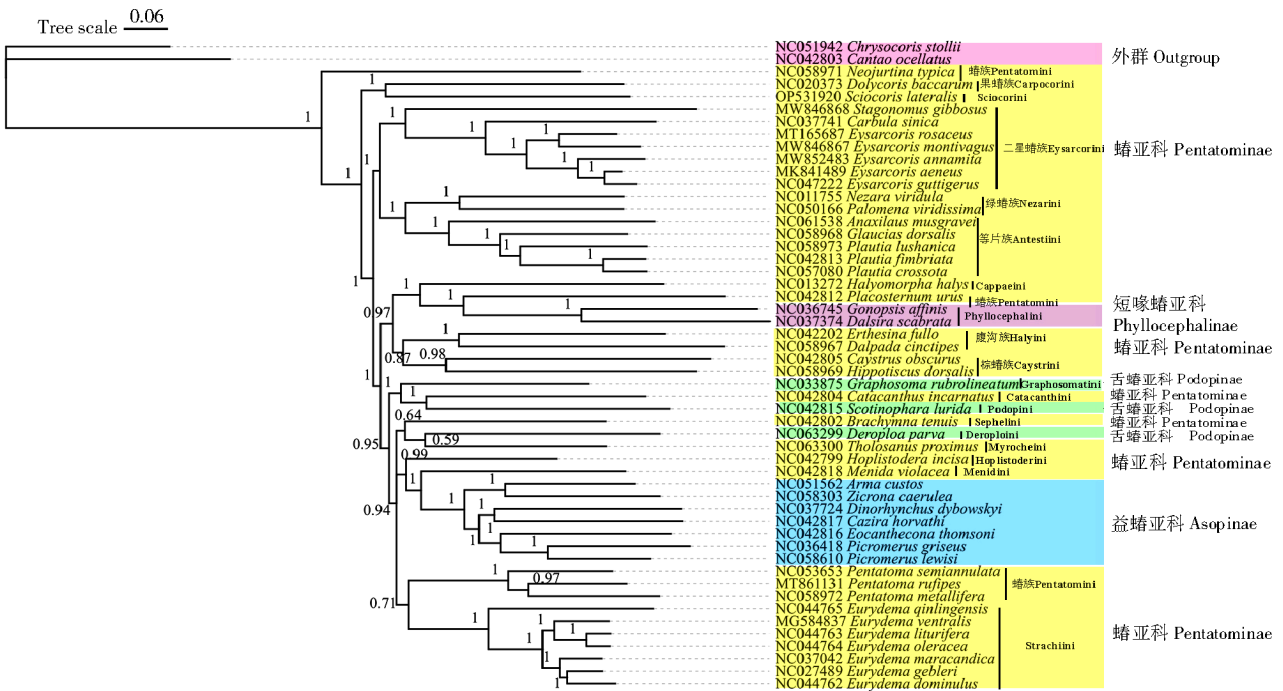


图 8 基于 13 个蛋白编码基因序列构建的贝叶斯系统发育树
Fig.8 Bayesian phylogenetic tree based on 13 protein-coding gene sequences

3 结论与讨论

小片蝽线粒体基因组总长度为15 445 bp,包括了13个蛋白编码基因(PCGs),22个转运tRNA,2个核糖体rRNA基因和1个控制区,小片蝽线粒体基因组序列结构和顺序与其他蝽科物种的相同^[11-13]。碱基组成分析结果显示,小片蝽线粒体基因组全序列碱基含量组成为A(42.86%)、T(31.40%)、C(14.92%)、G(10.82%),AT含量为74.26%,AT偏斜值(AT-skew)为0.154,GC偏斜值(GC-skew)为-0.159。

根据相对密码子使用频率(RSCU)分析发现,小片蝽密码子的使用频率具有不均质性,NNU、NNA的相对同义密码子使用频率比较高,碱基A和U的出现频率高于G和C,说明了第3位密码子富含碱基AT,这可能是PCGs序列中AT偏斜大于GC偏斜的原因。其中位于N链蛋白质编码基因的T含量都达到了50%以上,而位于J链的T含量在30%~39%,因此位于编码N链蛋白质编码基因中T偏斜值较大,具有明显的AT偏好性。起始密码子既有典型的ATN,也有非典型的TTG;大部分蛋白编码基因终止密码子为TAA或者TAG,少部分基因终止密码子为TA或T,这种情况在半翅目昆虫线粒体组中较为常见^[14-15]。

通过计算线粒体基因的替代率,蝽科物种13个PCGs的Ka/Ks值均低于1,说明该基因均处于纯化选择阶段,atp8的Ka/Ks值最高,进化速率快。这类进化速率较快的基因(例如atp8、nad4l、nad6)的AT含量都比较高;cox1的Ka/Ks的比值最低,进化速率缓慢。这类进化速率较慢的基因(例如cox1、cox2、cox3、cytb)的AT含量普遍偏低,综上所述,碱基的AT含量偏斜与进化速率相关,cox1基因结构相对保守。因此,广泛利用cox1基因进行近缘种间的鉴定和系统进化研究^[16-20]。

对小片蝽22个tRNA的二级结构研究发现,tmS1和tmV缺失了DHU臂不能正常折叠形成典型的三叶草型二级结构。研究发现,半翅目昆虫的tmS1基因均缺少DHU臂,还有一些物种的tRNA也缺失DHU臂,例如菜蝽属物种tmS1和tmV均缺失DHU臂,tRNAs基因存在一些碱基错配的现象,错配最多是碱基G与碱U,这些情况在蝽科物种很常见^[6,13,19-21,22-23]。基于13个PCG构建的蝽科ML和BI系统发育树结果显示,小片蝽处于蝽亚科分支,小片蝽与斑须蝽*D.baccarum*的亲缘关系最

近,但该分类单元的单系性仍需通过更广泛的类群取样来检验;腹沟族Halyini与棕蝽族Caystrini族间存在关系,具有较高的支持率,且这2个族的物种形态特征有相似之处:臭腺沟缘长、挥发域面积大且界限明显等;绿蝽族Nezarini和等片族Antestiini聚为一簇。形态分类上,Rider将绿蝽族Nezarini的珀蝽属*Plautia*暂时放置于等片族Antestiini内,本研究系统发育树支持这一结论。结果还显示,Strachiini形成一个单系群,秦岭菜蝽*Eurydema qinlingensis*是Strachiini分化较早的一支;二星蝽族Eysarcorini 2个属二星蝽属*Eysarcoris*、辉蝽属*Carbula*形成稳定的分支,结果高度支持该族的单系性,与学者研究结果一致^[24];益蝽亚科是一个单系,但与蝽亚科曼蝽属*Menida*形成姐妹群关系,舌蝽亚科3个族物种与蝽亚科聚在一起,说明舌蝽亚科不是一个单系群,而是与蝽亚科形成并系群,短喙蝽亚科物种聚为一支并与蝽亚科蝽族形成姐妹群。有研究认为,应该重新审视益蝽亚科、短喙蝽亚科、舌蝽亚科在蝽科的亚科地位,建议将它们作为蝽亚科的族级阶元看待^[25]。

本研究通过对小片蝽线粒体全基因组的报道,丰富了蝽科线粒体基因组数据库,同时为蝽科系统发育关系的进一步探讨提供了一定的理论基础。对蝽科的深入研究还需后期补充大量蝽科物种基因组,同时,需结合形态学、生物学特性等进一步阐明蝽科系统发育关系,从而构建更合理的蝽科各阶元间的进化关系。

参考文献:

- [1] 赵清. 中国益蝽亚科修订及蠃蝽属、辉蝽属和二星蝽属的DNA分类学研究(半翅目:蝽科)[D]. 天津:南开大学,2013.
ZHAO Q. A revision of the asopinae from China and the study of DNA taxonomy of *Arma*, *Carbula* and *Eysarcoris* (Hemiptera: Pentatomidae)[D]. Tianjin: Nankai University, 2013.
- [2] 韩二牛,刘玉光,刘永利,等. 乌兰布和沙漠昆虫区系调查初报[J]. 内蒙古林业科技,2002,28(S1):27-31.
HAN E N, LIU Y G, LIU Y L, et al. Preliminary report on insect fauna in Wulanbuhe Desert[J]. Journal of Inner Mongolia Forestry Science and Technology, 2002, 28(S1): 27-31.
- [3] 李国锋,侯云萍,王春梅,等. 西双版纳奇楠沉香林昆虫群落结构与功能研究[J]. 四川动物,2016,35(2):190-200.
LI G F, HOU Y P, WANG C M, et al. Research on the structure and function of insect communities in *Aquilaria crassna* forest of Xishuangbanna[J]. Sichuan Journal of Zoology, 2016, 35(2): 190-200.
- [4] 范中华. 中国蝽亚科的系统学研究(半翅目:异翅亚目:蝽科)[D]. 天津:南开大学,2011.
FAN Z H. The study on systematics of Pentatominae from

- China (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae) [D]. Tianjin: Nankai University, 2011.
- [5] WOLSTENHOLME D R. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution[J]. International Review of Cytology, 1992, 141:173-216.
- [6] 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, 46(2):151-166.
GUO Z L, YUAN M L. Research progress of mitochondrial genomes of Hemiptera insects[J]. Scientia Sinica (Vita), 2016, 46(2):151-166.
- [7] KEARSE M, MOIR R, WILSON A, et al. Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data[J]. Bioinformatics, 2012, 28(12):1647-1649.
- [8] ROZAS J, FERRER-MATA A, SÁNCHEZ-DELBARRIO J C, et al. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2017, 34(12):3299-3302.
- [9] 王会伟,朱世新,张新友,等. 油莎豆基因组大小、倍性和系统发育分析[J]. 河南农业科学, 2023, 52(1):34-41.
WANG H W, ZHU S X, ZHANG X Y, et al. Genome size, ploidy and phylogeny of *Cyperus esculentus* L. [J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2023, 52(1):34-41.
- [10] RONQUIST F, TESLENKO M, VAN DER MARK P, et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space[J]. Systematic Biology, 2012, 61(3):539-542.
- [11] HUA J M, LI M, DONG P Z, et al. Comparative and phylogenomic studies on the mitochondrial genomes of Pentatomomorpha (Insecta: Hemiptera: Heteroptera) [J]. BMC Genomics, 2008, 9:610.
- [12] 姜培. 异翅亚目昆虫比较线粒体基因组学及系统发育关系研究[D]. 北京:中国农业大学, 2017.
JIANG P. Studies on the comparative mitochondrial genomics and phylogeny of heteroptera (insecta: Hemiptera)[D]. Beijing: China Agricultural University, 2017.
- [13] 高晓云,魏久锋,丁晓飞,等. 全蝽线粒体全基因组序列及其进化分析[J]. 山西农业科学, 2022, 50(9):1240-1248.
GAO X Y, WEI J F, DING X F, et al. Mitochondrial genome sequence and evolution analysis of *Homalagonia obtusa*[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2022, 50(9):1240-1248.
- [14] 闫艳,程梦迪,曹春桥,等. 访花昆虫野蚜蝇线粒体基因组结构分析[J]. 环境昆虫学报, 2021, 43(4):992-1002.
YAN Y, CHENG M D, CAO C Q, et al. Structural analysis of complete mitochondrial genome of *Syrphus torvus* (Osten-Sacken) of a flower-visiting insect[J]. Journal of Environmental Entomology, 2021, 43(4):992-1002.
- [15] 李根丽,王宇宸,刘鑫阳,等. 褐兜蝽线粒体全基因组序列及系统发育分析[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2023, 52(2):149-159.
LI G L, WANG Y C, LIU X Y, et al. Complete mitochondrial genome and phylogenetic analysis of *Coridius brunneus*[J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2023, 52(2):149-159.
- [16] ZHAO L, WEI J F, ZHAO W Q, et al. The complete mitochondrial genome of *Pentatoma rufipes* (Hemiptera: Pentatomidae) and its phylogenetic implications[J]. Zoo Keys, 2021, 1042:51-72.
- [17] WANG Y Y, DUAN Y B, YANG X F. The complete mitochondrial genome of *Plautia crossota* (Hemiptera: Pentatomidae) [J]. Mitochondrial DNA. Part B, Resources, 2019, 4(2):2281-2282.
- [18] LEE W, KANG J, JUNG C, et al. Complete mitochondrial genome of brown marmorated stink bug *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae), and phylogenetic relationships of hemipteran suborders[J]. Molecules and Cells, 2009, 28(3):155-165.
- [19] 赵婉清. 中国菜蝽属 DNA 条形码和线粒体基因组学研究(半翅目:蝽科)[D]. 太谷:山西农业大学, 2018.
ZHAO W Q. DNA barcoding and mitochondrial genomes of Chinese species of the genus *Eurydema* (Hemiptera: Pentatomidae)[D]. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2018.
- [20] 杨倩倩,李志红,伍祎,等. 线粒体 CO I 基因在昆虫 DNA 条形码中的研究与应用[J]. 应用昆虫学报, 2012, 49(6):1687-1695.
YANG Q Q, LI Z H, WU Y, et al. Advance and application of mtDNA CO I barcodes on insects[J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2012, 49(6):1687-1695.
- [21] 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.
- [22] LIU Y Q, LI H, SONG F, et al. Higher-level phylogeny and evolutionary history of Pentatomomorpha (Hemiptera: Heteroptera) inferred from mitochondrial genome sequences[J]. Systematic Entomology, 2019, 44(4):810-819.
- [23] 邓黎,王刚,卢聪聪,等. 高桥仁蚱线粒体全基因组测序与分析[J]. 昆虫学报, 2022, 65(4):451-459.
DENG J, WANG G, LU C C, et al. Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of *Aclerda takahashii* (Hemiptera: Aclerdidae)[J]. Acta Entomologica Sinica, 2022, 65(4):451-459.
- [24] LI R R, LI M, YAN J, et al. Five mitochondrial genomes of the genus *Eysarcoris* Hahn, 1834 with phylogenetic implications for the pentatominae (Hemiptera: Pentatomidae) [J]. Insects, 2021, 12(7):597.
- [25] ROCA-CUSACHS M, SCHWERTNER C F, KIM J, et al. Opening *Pandora's* box: molecular phylogeny of the stink bugs (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae) reveals great incongruences in the current classification[J]. Systematic Entomology, 2022, 47(1):36-51.