

doi: 10.3969/j.issn.1674-0858.2016.03.16

基于 16S rDNA 与 Cytb 序列的疏广蜡蝉属 三个近似种的分子鉴定 (半翅目: 蜡蝉总科: 广翅蜡蝉科)

刘 沅^{1,2}, 张玉波^{1,2,4}, 杨 琳^{1,2}, 陈祥盛^{1,2,3*}

(1. 贵州大学昆虫研究所, 贵阳 550025; 2. 昆虫资源开发利用省级特色重点实验室, 贵阳 550025;

3. 贵州大学动物科学学院, 贵阳 550025; 4. 安顺学院化学化工学院, 贵州安顺 561000)

摘要: 本文通过 PCR 扩增首次获得了疏广蜡蝉属 *Euricania* Melichar, 1898 3 个近似种: 透明疏广蜡蝉 *E. clara* Kato, 1932、长刺疏广蜡蝉 *E. longa* Xu, Liang & Jiang, 2006 和短刺疏广蜡蝉 *E. brevicula* Xu, Liang & Jiang, 2006 的 16S rDNA 序列和 Cytb 序列; 使用 MEGA 6.0 软件, 分析了其序列组成及变异, 计算了遗传距离, 以宽广蜡蝉属 *Pochazia* Amyot & Serville, 1843 的圆纹宽广蜡蝉 *P. guttifera* Walker, 1851 和眼斑宽广蜡蝉 *P. discreta* Melichar, 1898 为外群, 利用邻接法 (NJ) 和最大简约法 (MP) 构建了系统发育树。结果显示: 透明疏广蜡蝉、长刺疏广蜡蝉和短刺疏广蜡蝉的 16S rDNA 序列长度分别为 414 bp, 404 bp, 435 bp, 而 Cytb 基因序列长度分别为 492 bp, 468 bp, 472 bp, 三者的序列比对、碱基组成成分存在差异; 2 属 5 种广翅蜡蝉 16S rDNA 基因的种间遗传距离为 0.008–0.098, 属间遗传距离为 0.122–0.197, 而 Cytb 基因的种间遗传距离为 0.038–0.055, 属间遗传距离为 0.181–0.188, 表明 16S rDNA 和 Cytb 基因序列可作为 DNA 条形码候选基因片段, 用于广翅蜡蝉近似属、种的分子鉴定。系统发育树的拓扑结构显示, 3 个近似种的亲缘关系基本一致, 各自聚为一支, 且置信值均达 96% 以上。本文亦结合了透明疏广蜡蝉、长刺疏广蜡蝉和短刺疏广蜡蝉形态学特征的差异对其进行了讨论和分析。

关键词: 广翅蜡蝉科; 疏广蜡蝉属; 16S rDNA; Cytb; 分子鉴定

中图分类号: Q963; S433.39

文献标志码: A

文章编号: 1674-0858 (2016) 03-0557-08

Molecular identification of three similar species of genus *Euricania* based on 16S rDNA and Cytb gene sequences (Hemiptera: Fulgoroidea: Ricaniidae)

LIU Yuan^{1,2}, ZHANG Yu-Bo^{1,2,4}, YANG Lin^{1,2}, CHEN Xiang-Sheng^{1,2,3*} (1. Institute of Entomology, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Special Key Laboratory for Development and Insect Resources, Guiyang 550025, China; 3. College of Animal Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 4. College of Chemistry and Chemical Engineering, Anshun College, Anshun 561000, Guizhou Province, China)

Abstract: 16S rDNA and Cytb sequences of three species of *Euricania* (Hemiptera: Fulgoroidea: Ricaniidae), were obtained for the first time. Sequence compositions, variations and genetic distances of the three species were analyzed and the phylogenetic tree of them based on neighbor-joining (NJ) and maximum parsimony (MP) methods were constructed using MEGA 6.0 software, *Pochazia guttifera* and *P. discreta* were chosen as outgroups. The results showed that: 16S rDNA sequence length of *E. clara*, *E.*

基金项目: 贵州省国际合作项目 (黔科合外 G 字 [2010] 7005 号); 贵州省科技厅三方联合基金 (黔科合 LH 字 [2014] 7503)

作者简介: 刘沅, 男, 1990 年生, 汉族, 湖南桃源人, 硕士, 研究方向为节肢动物系统学与分子生物学, E-mail: 1162959771@qq.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: chenxs3218@163.com

收稿日期 Received: 2015-09-24; 接受日期 Accepted: 2015-12-06

longa and *E. brevicula* was 414 bp, 404 bp, 435 bp, and Cytb gene sequence lengths were 492 bp, 468 bp, 482 bp. Sequence alignment and base composition of them were different; the interspecific genetic distances among these species in 16S rDNA gene were 0.008–0.098, the genera distances were 0.122–0.197, while the interspecific genetic distances among these species in Cytb gene were 0.038–0.055, the genera distances were 0.181–0.188. Therefore as candidate gene fragment of barcoding, 16S rDNA and Cytb genes can be used to molecular identification of species and genera of Ricaniidae. The topology of phylogenetic tree indicated that genetic relationship of these species was basically identical, distinguished from each other, and all confidence values reached over 96%. We also discussed and analyzed the differences of morphological characteristics of three euricanian species in this paper.

Key words: Ricaniidae; *Euricania*; 16S rDNA; Cytb; molecular identification

广翅蜡蝉科 Ricaniidae 昆虫隶属于半翅目 Hemiptera 头喙亚目 Auchenorrhyncha 蜡蝉总科 Fulgoroidea, 是蜡蝉总科中较小的科 (周尧等, 1985)。该科昆虫均为植食性, 大多数种类为重要的农林害虫。它们通过刺吸式口器刺吸植物汁液、在作物组织中产卵或传播植物病病毒。危害的对象包括柑橘、葡萄、苹果、柿、油茶等重要经济作物, 给农林生产造成巨大的损失 (刘永生, 2001)。疏广蜡蝉属 *Euricania* Melichar, 1898 隶属于广翅蜡蝉科 Ricaniidae, 由 Melichar 于 1898 年以 *E. ocellus* (Walk, 1851) 为模式种所建立, 目前全世界已知 43 种, 分布于东洋区、古北区和澳洲区。该属中国目前记录 6 种 (Chou and Lu, 1977; Yang, 1989), 分别是透明疏广蜡蝉 *E. clara* Kato、眼纹疏广蜡蝉 *E. ocellus* Walk、短刺疏广蜡蝉 *E. brevicula* Xu, Liang & Jiang、长刺疏广蜡蝉 *E. longa* Xu, Liang & Jiang、西藏疏广蜡蝉 *E. xizangensis* Zhou & Lu 和带纹疏广蜡蝉 *E. facialis* Melichar, 主要分布于中国华南和西南地区。其中, 疏广蜡蝉属中的透明疏广蜡蝉、长刺疏广蜡蝉和短刺疏广蜡蝉的外形相近, 雄性外生殖器结构差异程度也不明显, 且三者 in 贵州和广西等地

均有分布, 这对该类昆虫的物种鉴定带来了困难。

目前, 研究近似种最有效的方法是结合形态和分子数据进行分类鉴定。为此, 本文首次提取了广翅蜡蝉科 Ricaniidae 宽广蜡蝉属 *Pochazia* 的圆纹宽广蜡蝉 *P. guttifera* 和眼斑宽广蜡蝉 *P. discreta*, 以及疏广蜡蝉属的 3 个近似种 (透明疏广蜡蝉、长刺疏广蜡蝉和短刺疏广蜡蝉) 的基因组, 通过特异性引物采用 PCR 扩增的方法获得其 16S rDNA 和 Cytb 序列片段, 利用邻接法 (NJ) 和最大简约法 (MP) 构建了系统发育树, 并结合其形态结构对其物种的差异进行讨论和分析, 以期广翅蜡蝉科的分属和系统学提供详细的科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用标本的采集信息详见表 1, 绘制了透明疏广蜡蝉、长刺疏广蜡蝉和短刺疏广蜡蝉的形态特征图 (图 1、图 2)。样品冷冻保存于贵州大学昆虫研究所, 雄性外生殖器保存于甘油中, 以备查用。

表 1 供试昆虫的采集信息
Table 1 Insect information for this study

序号 No.	属名 Genus name	种名 Species name	数量 Quantity	采集地 Collection places	采集时间 (yy-mm-dd) Acquisition time
1	疏广蜡蝉属 <i>Euricania</i>	透明疏广蜡蝉 <i>E. clara</i>	11 ♂♂	贵州省宽阔水保护区	2014-07-26
2	疏广蜡蝉属 <i>Euricania</i>	长刺疏广蜡蝉 <i>E. longa</i>	10 ♂♂	贵州省梵净山保护区	2014-08-07
3	疏广蜡蝉属 <i>Euricania</i>	短刺疏广蜡蝉 <i>E. brevicula</i>	12 ♂♂	贵州省梵净山保护区	2014-08-07
4	宽广蜡蝉属 <i>Pochazia</i>	圆纹宽广蜡蝉 <i>P. guttifera</i>	1 ♂	贵州龙架山森林公园	2014-07-27
5	宽广蜡蝉属 <i>Pochazia</i>	眼斑宽广蜡蝉 <i>P. discreta</i>	1 ♂	浙江省清凉峰保护区	2014-08-06

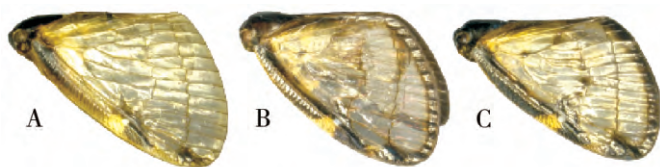


图1 疏广翅蜡蝉属 3 个近似种成虫侧面观

Fig. 1 Habitus of three similar species of *Euricania* in lateral view

A, 透明疏广蜡蝉; B, 长刺疏广蜡蝉; C, 短刺疏广蜡蝉。比例尺 = 0.5 mm。A, *E. clara*; B, *E. longa*; C, *E. brevicula*. Scale bars = 0.5 mm.

1.2 实验方法

1.2.1 仪器设备

Olympus SZ2-ILST 型光学体视显微镜 (德国 Leica 公司), T100™ Thermal Cycler 型 PCR 扩增仪 (美国 BIO-RAD 公司), 170-8170 型 UVP 凝胶成像系统 (美国 BIO-RAD 公司), Power Pac™ HV Power Supply 型电泳仪 (美国 BIO-RAD 公司), Mini-40K 微型高速离心机 (珠海黑马医学仪器有限公司), HVE-50 型自动高压灭菌器等。

1.2.2 基因组 DNA 的提取

将冷冻保存于冰箱的标本取出, 在解剖镜下去除腹部放入甘油中保存, 剩余的虫体取头胸足



图2 疏广翅蜡蝉属 3 个近似种雄性外生殖器特征图

Fig. 2 Male morphological external genitals of three similar species of *Euricania*

A1 - A5: 透明疏广蜡蝉 *E. clara*; B1 - B5: 长刺疏广蜡蝉 *E. longa*; C1 - C5: 短刺疏广蜡蝉 *E. brevicula*.

A1, B1, C1: 生殖节, 左侧面观 (male genitalia, left lateral view); A2, B2, C2: 肛节, 背面观 (anal segment, dorsal view); A3, B3, C3: 阳茎, 背面观 (aedeagus, dorsal view); A4, B4, C4: 阳茎, 侧面观 (aedeagus, lateral view); A5, B5, C5: 阳茎, 腹面观 (aedeagus, ventral view). 比例尺 (Scale bars) = 1 mm (A1, B1, C1); 0.5 mm (A2 - A5, B2 - B5, C2 - C5).

等部分标号后在实验台上研磨至粉末状,然后用天根生化科技(北京)有限公司生产的柱式血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒提取总 DNA,最后用 TE 洗脱液将总 DNA 洗脱出来,用干净的离心管保存于 -20°C 的冰箱中备用。

1.2.3 PCR 扩增及产物检测

将上述的总 DNA 作为 PCR 扩增的模板,16S rDNA 扩增的引物序列参考文献 (Yeh *et al.*, 2005) 的方法设计,引物序列为: 16S-PF (5'-GCCTGTTTATCAAAAACAT-3'); 16S-PR (5'-CCG GTCTGAACTCAGATCA-3') Cytb 扩增的引物序列参考文献 (Ceotto *et al.*, 2008) 的方法设计,引物序列为: Cytb-PF (5'-TATGTACTACCATGAGGACAAA TATC-3'); Cytb-PR (5'-ATCTTAATGCAATAACT CCTCC-3')。引物由北京华大基因研究中心合成。扩增体系参照叶文斌 (2005),反应体系为 25 μL , 内含 10 mmol/L Tris (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 0.01% Triton X-100, 2.0 mmol/L MgCl_2 , 0.2 mmol/L dNTPs, 0.2 mmol/L 引物, 1.0 μL Taq 酶以及 1 μL DNA 模板。16S 基因序列 PCR 反应程序为: 95°C 预变性 7 min; 95°C 变性 50 s, 50°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1 min, 35 个循环; 72°C 延伸 10 min; Cytb 基因序列 PCR 反应程序为: 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 1 min, 54°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1 min, 35 个循环; 72°C 延伸 10 min。PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测其片段大小、纯度及含量。

1.2.4 PCR 产物回收与测序

PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分离,用天根生化科技(北京)有限公司生产的柱式琼脂糖凝胶回收试剂盒进行回收纯化。PCR 样品经检测合格后送上海生工生物科技股份有限公司进行测序,测序仪为 ABI 3730XL 测序仪,反应试剂为 BigDye

Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)。

1.2.5 序列分析及系统发育关系

本试验测定了广翅蜡蝉科 2 属 5 种 (表 1) 的 16S rDNA 和 Cytb 基因序列,使用 SeqMan 以及 BioEdit 软件对其进行序列拼接、比对、编辑等分析 (Thompson *et al.*, 1994); 通过系统分析软件 MEGA 6.0 软件计算遗传距离矩阵,分析其碱基组成、变异位点、简约信息位点和遗传距离等。系统发育分析以宽翅蜡蝉属的圆纹宽翅蜡蝉为外群,采用邻接法 (NJ 法) 和最大简约法 (MP 法) 构建分子系统树,同时应用 Bootstrap 1000 次自举检验系统树中各结点的置信值。

2 结果与分析

2.1 碱基组成及序列变异

利用 MEGA 6.0 软件对本研究中获得的 16S rDNA 和 Cytb 基因序列进行分析,分析结果显示: 16S rDNA 序列长度为 392 bp,其中, A、T、G、C 含量分别是 30.2%、45.1%、16.4%、8.3%, A + T 的平均含量为 75.3%, G + C 的平均含量为 24.7%; 共检测到保守位点 301 个,变异位点 90 个,简约信息点 32 个,自裔位点 58 个,变异位点约占总序列的 22.96%。Cytb 基因序列长度为 452 bp,其中, A、T、G、C 含量分别是 35.8%、32.9%、11.4%、20.0%, A + T 的平均含量为 68.7%, G + C 的平均含量为 31.4%; 共检测到保守位点 333 个,变异位点 119 个,简约信息点 55 个,自裔位点 64 个,变异位点约占总序列 26.33%。

表 2 16S rDNA 和 Cytb 基因序列组成成分统计值

Table 2 Statistics of sequence nucleotide composition of 16S rDNA and Cytb gene

序列 Sequence	长度 Length	C	V	Pi	S	A%	T%	G%	C%	A + T%	G + C%
16S rDNA	392	301	90	32	58	30.2	45.1	16.4	8.3	75.3	24.7
Cytb	452	333	119	55	64	35.8	32.9	11.4	20.0	68.7	31.4

2.2 遗传距离

利用 MEGA 6.0 软件计算不同个体的 16S rDNA 和 Cytb 基因序列间的遗传距离 (表 3 和表 4)。对于 16S rDNA, 内群种间的遗传距离为 0.008 - 0.098, 其中透明疏广蜡蝉与长刺疏广蜡蝉

遗传距离为 0.096, 透明疏广蜡蝉与短刺疏广蜡蝉遗传距离为 0.098, 长刺疏广蜡蝉与短刺疏广蜡蝉遗传距离为 0.008; 内群与外群之间的属间遗传距离为 0.122 - 0.197 (圆纹宽翅蜡蝉与透明疏广蜡蝉遗传距离为 0.197, 圆纹宽翅蜡蝉与长刺疏广蜡

蝉遗传距离为 0.122, 圆纹宽广蜡蝉与短刺疏广蜡蝉遗传距离为 0.127)。对于 Cytb 基因, 内群种间的遗传距离为 0.038 – 0.055, 其中透明疏广蜡蝉与长刺疏广蜡蝉遗传距离为 0.055, 透明疏广蜡蝉与短刺疏广蜡蝉遗传距离为 0.038, 长刺疏广蜡蝉与短刺疏广蜡蝉遗传距离为 0.049; 内群与外群的属间遗传距离为 0.181 – 0.188 (圆纹宽广蜡蝉与透明疏广蜡蝉遗传距离为 0.181; 圆纹宽广蜡蝉与长刺疏广蜡蝉遗传距离为 0.186; 圆纹宽广蜡蝉与短刺疏广蜡蝉遗传距离为 0.188)。从上述遗传距离 (表 3 和表 4) 可以看出, 属间最小遗传距离远大于种间最大遗传距离。

表 3 供试广翅蜡蝉 16S rDNA 序列的遗传距离
Table 3 Genetic distances of 16S rDNA of five Ricaniid species

序号 No.	种类 Species	GenBank 登录号 GenBank accession	遗传距离 Genetic distances				
			1	2	3	4	5
1	透明疏广蜡蝉 <i>Euricania clara</i>	KT633879					
2	长刺疏广蜡蝉 <i>Euricania longa</i>	KT633878	0.096				
3	短刺疏广蜡蝉 <i>Euricania brevicula</i>	KT633877	0.098	0.008			
4	圆纹宽广蜡蝉 <i>Pochazia guttifera</i>	KT633876	0.197	0.122	0.127		
5	眼斑宽广蜡蝉 <i>Pochazia discreta</i>	KT633875	0.197	0.127	0.132	0.067	

表 4 供试广翅蜡蝉 Cytb 基因序列的遗传距离
Table 4 Genetic distances of Cytb gene of five Ricaniid species

序号 No.	种类 Species	GenBank 登录号 GenBank accession	遗传距离 Genetic distances				
			1	2	3	4	5
1	透明疏广蜡蝉 <i>E. clara</i>	KT633884					
2	长刺疏广蜡蝉 <i>E. longa</i>	KT633883	0.055				
3	短刺疏广蜡蝉 <i>E. brevicula</i>	KT633882	0.038	0.049			
4	圆纹宽广蜡蝉 <i>P. guttifera</i>	KT633881	0.181	0.186	0.188		
5	眼斑宽广蜡蝉 <i>P. discreta</i>	KT633880	0.195	0.184	0.190	0.017	

2.3 系统发育分析

以宽广蜡蝉属作为外群, 利用 MEGA 6.0 软件基于 16S rDNA 序列构建系统发育树 (邻接法和最大简约法), 并利用自展法 (bootstrap) 1000 进行置信度检验。基于 16S rDNA 构建的系统发育树中, 得到了一致的拓扑结构, 并得到了较高的检验支持率。疏广蜡蝉属的 3 个种聚为一支, 与宽广蜡蝉属的两个种形成姐妹群关系, 其中长刺疏

广蜡蝉与短刺疏广蜡蝉聚亲缘比较相近, 与透明疏广蜡蝉的亲缘关系较远; 疏广蜡蝉属的 3 个种与眼斑宽广蜡蝉的亲缘关系较近, 而与圆纹宽广蜡蝉的亲缘关系较远。基于 Cytb 基因序列构建的系统发育树中, 也得到了一致的拓扑结构, 并利用自展法 (bootstrap) 进行置信度检验, 也得到了很高的支持率。疏广蜡蝉属的 3 个种聚为一支, 与宽广蜡蝉属的两个种形成姐妹群关系, 其中透

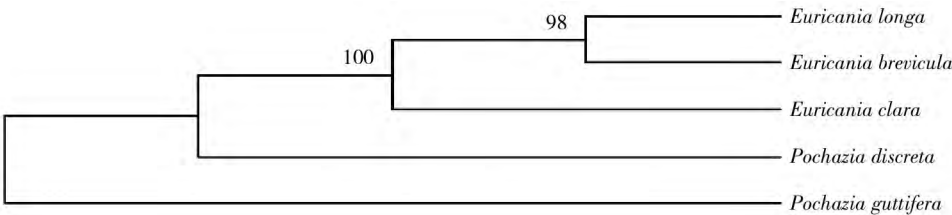


图 3 5 种广翅蜡蝉 16S rDNA 基因序列进化树 (NJ tree)
Fig. 3 Neighbor Joining tree for 16S rDNA gene of five Ricaniidae

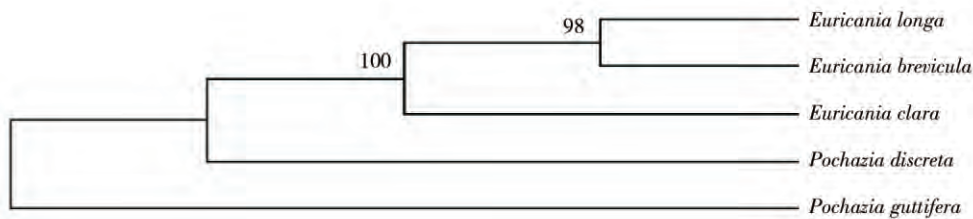


图4 5种广翅蜡蝉 16S rDNA 基因序列进化树 (MP tree)

Fig. 4 Maximum parsimony tree for 16S rDNA gene of five Ricaniidae

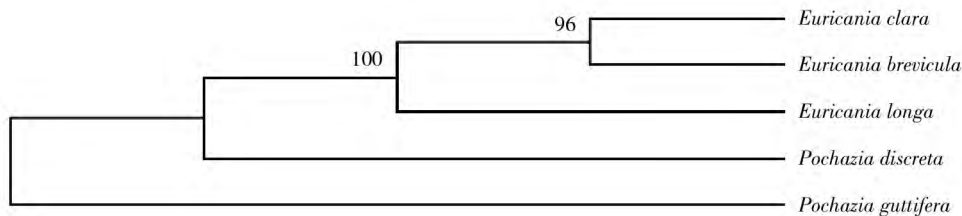


图5 5种广翅蜡蝉 Cytb 基因序列进化树 (NJ tree)

Fig. 5 Neighbor Joining tree for Cytb gene of five Ricaniidae

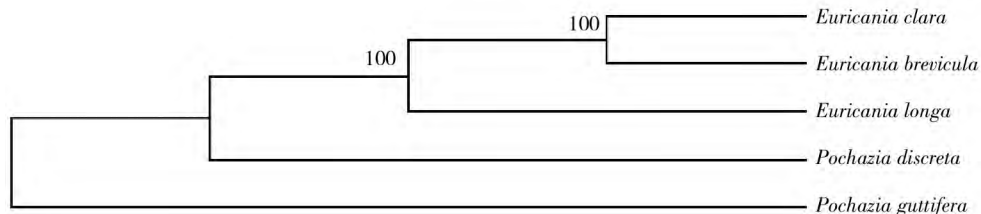


图6 5种广翅蜡蝉 Cytb 基因序列进化树 (MP tree)

Fig. 6 Maximum parsimony tree for Cytb gene of five Ricaniidae

明疏广蜡蝉与短刺疏广蜡蝉聚亲缘比较相近,与长刺疏广蜡蝉的亲缘关系较远;疏广蜡蝉属的3个种与眼斑宽广蜡蝉的亲缘关系较近,而与圆纹宽广蜡蝉的亲缘关系较远。

3 结论与讨论

3.1 疏广蜡蝉属3个种的序列分析

目前,广翅蜡蝉科昆虫主要依据形态学经典分类方法进行鉴定。然而对于近似种或近缘种来说,形态学分类在其物种鉴别中常受到挑战,往往容易造成同物异名和异物同名现象。本研究结合了分子生物学的方法对疏广蜡蝉属形态上很相似的3个种进行了分析,形态学上三者的主要区别(图1)在前翅、肛节、阳茎(刺突)等方面也有些许差异。透明疏广蜡蝉的前翅外缘无色

带,肛节较长,背面观卵形,长宽比约为1:1.2,阳茎粗壮,背刺突长约为阳茎的1/3;长刺疏广蜡蝉的前翅周缘有宽的暗褐色带,肛节较长,背面观梯形,长宽比约为1:1.4,阳茎粗壮,背刺突长约为阳茎的1/2;短刺疏广蜡蝉的前翅周缘有宽的淡褐色带,肛节较长,背面观呈窄的梯形,长宽比约为1:2,阳茎粗壮,背刺突长约为阳茎的1/3。

线粒体DNA基因组具有分子结构简单、严格的母系遗传、无重组、与核基因组无共同的序列、进化速度快、多拷贝等优点,比核DNA更容易获得和检测,亲缘关系相关或相近的物种都能得到很好的区分和鉴定(辛翠娜等,2009)。Cytb基因起源较晚,在属、种间存在多样性,变异率相对较高,是目前为止应用最广泛的基因序列之一,16S rDNA比Cytb基因进化速率要慢,在遗传进化

上具有相对稳定性 (马国强等, 2010)。在疏广蜡蝉属昆虫的研究中, 这两个基因片段都能很好的应用于种间分子鉴定。通过对其 16S rDNA 和 Cytb 基因序列的对比、碱基组成及序列变异分析、遗传距离分析以及系统发育树的研究表明, 疏广蜡蝉属不同物种间的遗传距离较小。其中, 基于 16S rDNA 基因的遗传距离为 0.008 – 0.098, 说明对于 16S rDNA 基因而言, 长刺疏广蜡蝉与短刺疏广蜡蝉的亲缘关系较近, 二者与透明疏广蜡蝉的亲缘关系较远; 基于 Cytb 基因的遗传距离为 0.038 – 0.055, 说明对于 Cytb 基因而言, 透明疏广蜡蝉与短刺疏广蜡蝉的亲缘关系较近, 长刺疏广蜡蝉与透明疏广蜡蝉和短刺疏广蜡蝉的亲缘关系较远。而属间遗传距离较大, 基于 16S rDNA 和 Cytb 基因的遗传距离分别为 0.122 – 0.197 和 0.181 – 0.188, 同属物种间遗传距离与属间遗传距离差别明显, 能很好的区分和鉴别疏广蜡蝉属的 3 个近似种。

以宽广蜡蝉属作为外群, 利用 MEGA 6.0 软件采用邻接法 (NJ 法) 和最大简约法 (MP 法) 基于 16S rDNA 和 Cytb 基因序列构建系统发育树, 并利用自展法 (bootstrap) 1000 进行置信度检验。结果显示系统发育树的拓扑结构一致, 并得到了较高的检验支持率。基于 16S rDNA 构建的系统发育树中, 疏广蜡蝉属的 3 个种聚为一支, 与宽广蜡蝉属的两个种形成姐妹群关系, 其中长刺疏广蜡蝉与短刺疏广蜡蝉聚亲缘比较相近, 与透明疏广蜡蝉的亲缘关系较远; 疏广蜡蝉属的 3 个种与眼斑宽广蜡蝉的亲缘关系较近, 而与圆纹宽广蜡蝉的亲缘关系较远。基于 Cytb 基因序列构建的系统发育树中, 疏广蜡蝉属的 3 个种聚为一支, 与宽广蜡蝉属的两个种形成姐妹群关系, 其中透明疏广蜡蝉与短刺疏广蜡蝉聚亲缘比较相近, 与长刺疏广蜡蝉的亲缘关系较远; 疏广蜡蝉属的 3 个种与眼斑宽广蜡蝉的亲缘关系较近, 而与圆纹宽广蜡蝉的亲缘关系较远。表明疏广蜡蝉属的 3 个近似种能用 16S rDNA 基因和 Cytb 基因序列进行分子鉴定和区分, 其结果也很好的支持了形态学的研究结果。

3.2 属间亲缘关系讨论

鉴于昆虫形态学鉴定方法受到昆虫雌雄个体与不同发育阶段的限制, 近年来分类学发展了不少新的研究方法, 其中分子生物学的研究方法就是很重要的一种方法。魏亦寒等 (2015) 介绍了

RFLP 等分子生物学技术在蚱虫分类鉴定中的应用, 张敏哲等 (2014) 测定了内蒙古 11 种主要草原蝗虫的线粒体基因组 16S rDNA 序列, 并构建了系统发生树, 其结果符合传统的以形态学为基础的分类体系。本研究中所用到的疏广蜡蝉属的透明疏广蜡蝉、长刺疏广蜡蝉和短刺疏广蜡蝉尽管在外形上极其相似, 但通过对其 16S rDNA 和 Cytb 基因序列的比对、碱基组成及序列变异分析、遗传距离分析以及构建系统发育树的研究表明, 三者在上述相关内容方面均有明显的差异, 能很好的验证其形态学上的研究结果。另外, 三者与外群宽广蜡蝉属的圆纹宽广蜡蝉与眼斑宽广蜡蝉的遗传距离远大于三者之间的遗传距离, 系统发育树的结果也表明了 2 个属能够相互构成姐妹群关系, 同理我们也可以将此方法应用到某些近缘属或近似属间的分子鉴定。

综上所述, 16S rDNA 与 Cytb 基因序列属于较好的种间遗传分子标记, 其分子序列分析可作为辅助手段用于解决很多形态学的疑难问题。同时, 分子生物学方法与技术的不断发展也必将是未来昆虫分类学研究的一个新的方向。

参考文献 (References)

- Ceotto P, Kergoat GJ, Rasplus JY, *et al.* Molecular phylogenetics of cixiid planthoppers (Hemiptera: Fulgoromorpha): New insights from combined analyses of mitochondrial and nuclear genes [J]. *Journal of Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2008, 48 (2): 667 – 678.
- Kato M. Notes on some Homoptera from South Manchuria [J]. *Journal of Kontyu*, 1932, 5 (5): 216 – 229.
- Liu YS, Zhang QL. A preliminary study on the biological characteristics and the control of *Ricania sublimbata* Gacodi [J]. *Journal of Subtropical Plant Science*, 2001, 30 (2): 39 – 41. 刘永生, 张青良. 柿广翅蜡蝉生物学特性及防治初报 [J]. *亚热带植物科学*, 2001, 30 (2): 39 – 41.
- Ma GQ, Gao TX, Sun DR. Discussion of relationship between *Collichthys lucidus* and *C. niveatus* based on 16S rRNA and Cytb gene sequences [J]. *South China Fisheries Science*, 2010, 6 (2): 13 – 20. 马国强, 高天翔, 孙典荣. 基于 16S rRNA 和 Cytb 基因序列探讨 2 种梅童鱼的遗传分化 [J]. *南方水产*, 2010, 6 (2): 13 – 20.
- Melichar L. Vorläufige Beschreibungen neuer Ricaniden [J]. *Journal of Zoologisch Botanischen*, 1898, 48 (3): 384 – 400.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice [J]. *Journal of Nucleic Acids Research*, 1994, 22 (22): 4673 – 4680.

- Wei YH, Zheng SZ, Cai P, *et al.* Application of molecular biology techniques in classification and identification of scale insects [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2015, 37 (4): 871–882.
- 魏亦寒, 郑斯竹, 蔡平, 等. 分子生物学技术在蚧虫分类鉴定中的应用 [J]. *环境昆虫学报*, 2015, 37 (4): 871–882]
- Xu CQ, Liang AP, Jiang GM. The genus *Euricania* Melichar (Hemiptera: Ricaniidae) from China [J]. *Journal of the Raffles Bulletin of Zoology*, 2006, 54 (1): 1–10.
- Xin CN, Peng JJ, Wang Y, *et al.* Application of Cytb gene as a molecular marker in species identification [J]. *Chinese Journal of Wildlife*, 2009, 30 (4): 217–221. [辛翠娜, 彭建军, 王莹, 等. Cytb 分子标记技术在物种鉴定中的应用 [J]. *野生动物杂志*, 2009, 30 (4): 217–221]
- Yang CT. Ricaniidae of Taiwan (Homoptera: Fulgoroidea) [J]. *Taiwan Museum Special Publication Series*, 1989, 8: 201–202.
- Yeh WB, Yang CT, Hui CF. A molecular phylogeny of planthoppers (Hemiptera: Fulgoroidea) inferred from mitochondrial 16S rDNA sequences [J]. *Journal of Zoological Studies*, 2005, 44 (4): 519–535.
- Zhou Y, Lu JS. On the Chinese Ricaniidae with descriptions of eight new species [J]. *Journal of Acta Entomologica Sinica*, 1977, 20 (3): 314–322. 周尧, 路进生. 中国的广翅蜡蝉科附八新种 [J]. *昆虫学报*, 1977, 20 (3): 314–322]
- Zhou Y, Lu JS, Huang J, *et al.* Economic Insects of China. Homoptera Fulgoroidea Fasc. 36 [M]. Beijing: Sciences Press, 1985: 70–85. 周尧, 路进生, 黄桔, 等. 中国经济昆虫志 (同翅目: 蜡蝉总科) 第 36 册 [M]. 北京: 科学出版社, 1985: 70–85]
- Zhang MZ, Zhou XR, Pang BP, *et al.* Sequence analysis of 16S rDNA of 11 main grasshopper species in Inner Mongolia grassland [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2014, 36 (4): 525–530. 张敏哲, 周晓榕, 庞保平, 等. 内蒙古 11 种主要草原蝗虫 16S rDNA 序列分析 [J]. *环境昆虫学报*, 2014, 36 (4): 525–530]