

基于 12S rRNA 和 16S rRNA 基因序列探讨中国蚤蝇科 部分属间的系统发育关系

赵丹彤^{1,2}, 刘广纯^{2,*}, 王剑峰²

(1. 沈阳农业大学 植物保护学院, 沈阳 110161; 2. 沈阳大学 生物与环境工程学院, 沈阳 110044)

摘要: 基于线粒体 12S rRNA 和 16S rRNA 基因序列联合分析, 采用最大简约法、最大似然法和贝叶斯法分别构建了中国蚤蝇科 14 属的系统发育树。结果表明: 联合分析序列总长度为 819 bp, 其中可变位点 277 个, 简约信息位点 200 个; A+T 平均含量为 77.7%, 具 A、T 偏倚性。系统发育分析显示: 中国蚤蝇科为单系发生, 分为蚤蝇亚科和裂蚤蝇亚科两个单系群。蚤蝇亚科内脉蚤蝇属、锥蚤蝇属和刺蚤蝇属亲缘关系较近, 栅蚤蝇属与栓蚤蝇属亲缘关系较近; 裂蚤蝇亚科中虻蚤蝇属与裂蚤蝇属互为姐妹群, 寡蚤蝇属与伐蚤蝇属互为姐妹群。

关键词: 蚤蝇科; 12S rRNA 基因; 16S rRNA 基因; 系统发育

中图分类号: Q969.451.8; Q349.1; Q951.3

文献标志码: A

文章编号: 0254-5853-(2010)04-0370-05

Phylogenetic Relationships Among Some Chinese Genera of Phoridae Based on Mitochondrial 12S and 16S rRNA Gene Sequences

ZHAO Dan-Tong^{1,2}, LIU Guang-Chun^{2,*}, WANG Jian-Feng²

(1. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China;

2. College of Biological and Environmental Engineering, Shenyang University, Shenyang 110044, China)

Abstract: The phylogenetic relationships among 14 Chinese genera of Phoridae were reconstructed based on concatenated sequences of the mitochondrial 12S and 16S rRNA genes using maximum parsimony, maximum likelihood and Bayesian methods. The alignment of the concatenated sequences spanned 819 sites including 277 variable sites, of which 200 were parsimony-informative. The sequences showed a 77.7% A+T bias. The phylogenetic analysis showed that the Phoridae was monophyletic. It was shown that the involved genera in the study clustered into monophyletic Phorinae and Metopininae. The genera *Diplonevra* and *Dohrniphora* were closely related to each other. The relationships among *Anevrina*, *Conicera* and *Spiniphora* were also closer. The genera *Metopina* and *Puliciphora* proved to be reciprocal sister group and the cluster analysis showed the close relationship between *Gymnophora* and *Phalacrotophora*.

Key words: Phoridae; 12S rRNA; 16S rRNA; Phylogeny

蚤蝇科 Phoridae 隶属于双翅目 Diptera 蚤蝇总科 Phoroidea, 世界已记载 250 属 3 400 余种(Brown, 2004)。蚤蝇个体较小(体长多为 1.5~3 mm)且雌雄异型现象广泛存在, 给其系统分类工作造成困难, 甚至出现混乱, 基于形态特征建立的分类体系及系统发生关系存在许多争议(Schmitz, 1929; Disney, 1991; Brown, 1992; Disney & Cumming, 1992; Disney, 1994; Disney, 2003)。Schmitz(1929)将蚤蝇科划分为蚤蝇亚科 Phorinae、扁蚤蝇亚科

Aenigmatiinae、裂蚤蝇亚科 Metopininae、头蟹蚤蝇亚科 Thaumatoxeninae、膨腹蚤蝇亚科 Alamirinae 和蟹蚤蝇亚科 Termitoxeninae, 这一系统一直沿用至今。依据该分类系统, 中国目前分布蚤蝇亚科和裂蚤蝇亚科蚤蝇 24 属 110 余种(Liu, 2001)。Hennig(1966; 1973)运用分支系统理论对蚤蝇科亲缘关系进行分析, 认为该分类系统中的一些亚科存在并系, 使该系统面临挑战。应用分子标记对正确理解蚤蝇科的系统发育关系有重要意义。分子生物

收稿日期: 2010-01-19; 接受日期: 2010-04-27

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 30270187)

*通讯作者(Corresponding author), E-mail: liugc@yahoo.cn

第一作者简介: 赵丹彤, E-mail: dantong8625@163.com

学技术已广泛用于昆虫系统学研究(Cheng et al, 2000), 但基于分子数据的蚤蝇系统发育工作较少, 而国内从分子水平对该类群的研究尚未见报道。

12S rRNA 和 16S rRNA 基因是常用线粒体分子标记, 其 DNA 序列较为保守, 可用于属、种间系统发育分析(Chen & Jiang, 2004; Nagaraja et al, 2004; Marquez et al, 2007; Han & Ro, 2009; Rohacek et al, 2009)。本研究尝试运用 12S rDNA 和 16S rDNA 片段, 结合 GenBank 中获得的相关序列进行

系统发育分析, 探讨中国蚤蝇科主要类群的系统发育关系。

1 材料和方法

1.1 实验材料

本研究所用蚤蝇材料及来源见表 1。标本从野外采集经鉴定后置于 75%乙醇保存备用。表 1 中序列 EU068630 和 EU068663(Kronforst et al, 2007)及序列 AF126XXX(Cook et al, 2004)来自 GenBank。

表 1 样品种类、来源及 GenBank 登录号
Tab. 1 Sample sources and the GenBank accession numbers

属 Genera	种 Species	GenBank 登录号	
		GenBank accession no.	
		16S rDNA	12S rDNA
蚤蝇属 <i>Phora</i> Latreille	<i>Phora holosericea</i>	GU361990	GU361976
	<i>Phora occidentata</i>	GU361993	GU361981
	<i>Phora capillosa</i>	GU361995	GU361983
	<i>Phora atra</i>	AF126332	AF126304
栓蚤蝇属 <i>Dohrniphora</i> Dahl	<i>Dohrniphora cornuta</i>	GU361998	GU361987
	<i>Dohrniphora insulana</i>	GU361999	GU361988
	<i>Dohrniphora trigonae</i>	AF126343	AF126315
异蚤蝇属 <i>Megaselia</i> Rondani	<i>Megaselia spiracularis</i>	GU361991	GU361977
	<i>Megaselia aequalis</i>	AF126328	AF126300
	<i>Megaselia scalaris</i>	AF126340	AF126312
栅蚤蝇属 <i>Diplonevra</i> Lioy	<i>Diplonevra taigaensis</i>	GU361996	GU361984
	<i>Diplonevra nitidula</i>	AF126326	AF126298
	<i>Diplonevra mortimeri</i>	AF126344	AF126316
锥蚤蝇属 <i>Conicera</i> Meigen	<i>Conicera similis</i>	AF126337	AF126309
	<i>Conicera kemp</i>	GU361992	GU361979
寒蚤蝇属 <i>Triphleba</i> Rondani	<i>Triphleba distinguenda</i>	AF126327	AF126299
	<i>Triphleba nudipalpis</i>	AF126330	AF126302
弧蚤蝇属 <i>Stichillus</i> Enderlein	<i>Stichillus</i> sp.	GU361994	GU361982
寡蚤蝇属 <i>Gymnophora</i> Macquart	<i>Gymnophora fastigiorum</i>	GU361997	GU361986
栉蚤蝇属 <i>Hypocera</i> Lioy	<i>Hypocera mordellaria</i>	GU362000	GU361989
裂蚤蝇属 <i>Metopina</i> Macquart	<i>Metopina pileata</i>	AF126329	AF126301
刺蚤蝇属 <i>Spiniphora</i> Malloch	<i>Spiniphora punctipennis</i>	AF126342	AF126314
脉蚤蝇属 <i>Anevrina</i> Lioy	<i>Anevrina thoracica</i>	AF126345	AF126317
蛇蚤蝇属 <i>Puliciphora</i> Dahl	<i>Puliciphora borinquensis</i>	AF126351	AF126323
伐蚤蝇属 <i>Phalacrotophora</i> Enderlin	<i>Phalacrotophora</i> sp.	EU068630	EU068663

1.2 DNA 提取、PCR 扩增及序列测定

标本经无菌水浸泡 24 h, 加 TE 缓冲液研碎, 再加入 SDS(1%)和蛋白酶 K(100 μg/mL), 56℃消化 6 h, 酚氯仿法提取蚤蝇总 DNA, 溶于无菌水中, -20℃保存备用。

本研究扩增 16S rDNA 片段所用引物为 LR-J-12887: 5'-CCG GTT TGA ACT CAG ATC ATG T-3', LR-N-13398: 5'-CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT-3'(Simon et al, 1994); 12S rDNA 片段所用引物为 SR-J-14199: 5'-TAC TAT GTT ACG ACT

TAT-3', SR-N-14594: 5'-AAA CTA GGA TTA GAT ACC C-3'(Kambhampati & Smith, 1995), 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

16S rDNA 片段扩增体系为 50 μ L, 包括 1 $\times$ PCR buffer、1.25 U *Taq* DNA 聚合酶、200 μ mol/L dNTP、0.2 μ mol/L 引物、2 μ L DNA 模板。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 56 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。12S rDNA 片段扩增体系同 16S rDNA, PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 51 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。扩增反应在 T-Gradient biometra 梯度 PCR 仪完成。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后送上海生工生物工程技术服务有限公司纯化和测序。

1.3 DNA 序列数据处理和系统发育分析

所得序列用 DNASTar 5.0 进行双向测序结果的拼接及序列校对, 并用 ClustalX 1.81 软件(Thompson et al, 1997)进行多重序列比对。使用 MEGA3.1 软件(Kumar et al, 2004)分析序列的碱基组成, 统计不同序列间的可变位点、简约信息位点, 基于 K2P 模型计算物种间遗传距离。本研究以 *Drosophila melanogaster* 和 *Opetia nigra* 为外群, 采用最大简约法(maximum parsimony, MP)、最大似然法(maximum likelihood, ML)和贝叶斯法(Bayesian inference, BI)构建分子系统树。用 PAUP*4.0b10 软件(Swofford, 2002)构建 MP 树和 ML 树, 对 MP 树和 ML 树分别进行 1000 次和 100 次拟重复抽样的 bootstrap 分析, 检验各节点的置信度; ML 树根据 Modeltest3.06(Posada & Crandall, 1998)估算数据最佳模型为 TVM+I+G; 用 MrBayes3.1(Huelsenbeck & Ronquist, 2001)软件构建贝叶斯树, 设置核苷酸替代类型数 nst=6, 位点间速率分布设置为 rates = gamma, 以随机树为起始树, 4 条马尔可夫链运行 100 万代, 每 100 代抽样并保存数据一次, 舍弃老化样本(2500 抽样代)后, 根据剩余样本构建合意树。

2 结果

2.1 序列分析

将 12S rRNA 基因测序结果比对剪切后得到的序列长度为 348 bp, 其中可变位点 125 个, 简约信息位点 89 个, A、T、G、C 碱基的平均含量分别为 39.3%、39.7%、7.6%、13.4%; 16S rRNA 基因

测序结果比对剪切后得到序列长度为 471 bp, 其中可变位点 152 个, 简约信息位点 111 个, A、T、G、C 碱基的平均含量分别为 39.3%、37.4%、8.7%、14.6%。将剪切后的 12S rRNA 和 16S rRNA 基因联合得到序列总长度为 819 bp, 其中可变位点 277 个, 简约信息位点 200 个, A、T、G、C 碱基的平均含量分别为 39.3%、38.4%、8.2%、14.1%。A+T 平均含量为 77.7%, 碱基组成表现出明显的偏倚。内群间遗传距离最小为 0.0014(*Conicera similis* 和 *Conicera kempii*), 最大为 0.1448(*Diplonevra mortimeri* 和 *Puliciphora borinquensis*)。由软件 DAMBE(Xia & Xie, 2001)进行序列替换饱和性分析。以转换、颠换数为纵轴, 以 TN93 模型校正距离为横轴做散点图。序列间的转换、颠换数随距离增加呈线性增长趋势, 未表现出饱和态势, 序列所有位点可用于系统发育分析。

2.2 分子系统树

本研究联合 12S rRNA 和 16S rRNA 基因序列分别构建了 MP 树、ML 树和贝叶斯树, 系统树各分支置信度以自举检验值和后验概率表示(置信度低于 50%未显示)。三棵树均显示蚤蝇科为单系发生, 所有内群明显分为两个分支。ML 树显示: 第一分支包括裂蚤蝇属 *Metopina*、蛇蚤蝇属 *Puliciphora*、伐蚤蝇属 *Phalacrotophora*、异蚤蝇属 *Megaselia* 和寡蚤蝇属 *Gymnophora*, 其余 9 属聚为第二个分支。第一分支中裂蚤蝇属、蛇蚤蝇属聚在一起, 然后再与异蚤蝇属相聚并与伐蚤蝇属和寡蚤蝇属聚成的小分支构成姐妹群; 第二分支形成两个小分支: 蚤蝇属(*Phora*)单独构成一个小分支, 其余 8 属构成另一个小分支。在后一小分支中, 锥蚤蝇属 *Conicera*、刺蚤蝇属 *Spiniphora*、脉蚤蝇属 *Anevrina*、栉蚤蝇属 *Hypocera* 构成的分支与栅蚤蝇属 *Diplonevra*、栓蚤蝇属 *Dohrniphora*、弧蚤蝇属 *Stichillus*、寒蚤蝇属 *Triphleba* 构成的分支互为姐妹群。MP 树与 ML 树的区别在于寒蚤蝇属的位置发生了变化。贝叶斯树与 ML 树的拓扑结构大致相似, 不同之处在于第一分支中形成三个平行支, 裂蚤蝇属和蛇蚤蝇属聚为一支, 寡蚤蝇属和伐蚤蝇属聚为一支, 异蚤蝇属单独构成一支; 第二分支形成六个平行支, 锥蚤蝇属、刺蚤蝇属和脉蚤蝇属构成一支, 栅蚤蝇属和栓蚤蝇属构成一支, 栉蚤蝇属、弧蚤蝇属、蚤蝇属和寒蚤蝇属各单独构成一支。

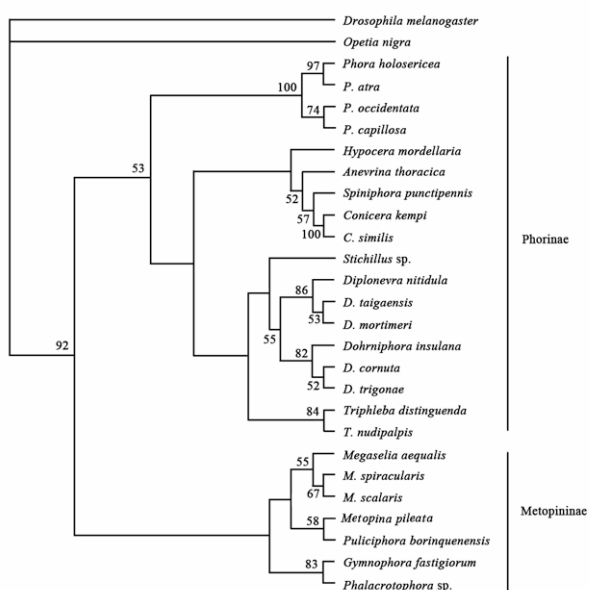


图 1 基于线粒体 12S rDNA 和 16S rDNA 部分序列构建的 ML 树

Fig. 1 ML tree derived from the concatenated sequences of mitochondrial 12S and 16S rDNA

各分支上的数字为系统树节点的置信度值。

The numbers above each branch indicate the ML bootstrap percentage.

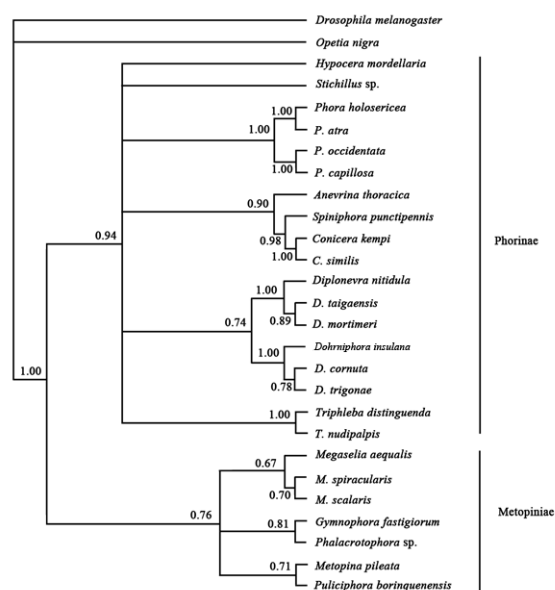


图 2 基于线粒体 12S rDNA 和 16S rDNA 部分序列构建的贝叶斯树

Fig. 2 Bayesian tree derived from the concatenated sequences of mitochondrial 12S and 16S rDNA

各分支上的数字为后验概率。

The numbers above each branch indicate the posterior probability.

3 讨论

本研究构建的三棵分子系统树均表明, 中国蚤蝇科为单系发生并分为两个单系群。栅蚤蝇属、栓蚤蝇属、弧蚤蝇属、栉蚤蝇属、蚤蝇属、寒蚤蝇属、脉蚤蝇属、锥蚤蝇属和刺蚤蝇属构成的单系群具有蚤蝇亚科许多原始的特征, 如中侧片不分裂、胫节具长鬃, 生殖腹板基部和腹部腹板无鬃等。裂蚤蝇属、蛇蚤蝇属、伐蚤蝇属、异蚤蝇属和寡蚤蝇属构成的单系群则由中侧片分裂、胫节缺大鬃等形态特征支持。通过本实验结果, 结合形态特征, 本文支持中国蚤蝇科分为蚤蝇亚科和裂蚤蝇亚科, 这与依据 Schmitz(1929)分类体系划分结果较为一致。

本文构建的系统树显示, 在蚤蝇亚科中栅蚤蝇属与栓蚤蝇属亲缘关系较近。形态学方面, 栅蚤蝇属与栓蚤蝇属之间较之与蚤蝇亚科其它属更为相似, 两者后足胫节均具有栅毛列, 存在翅 R_{2+3} 脉。

锥蚤蝇属、刺蚤蝇属和脉蚤蝇属相聚在一起, 表明此三属可能具有较近的亲缘关系。Brown(1992)基于形态特征研究认为, 脉蚤蝇属与刺蚤蝇属亲缘关系较近, 这与本文结果基本一致。

裂蚤蝇亚科中裂蚤蝇属与蛇蚤蝇属相聚, 从形态特征比较, 两属缺 R_{2+3} 脉, 与裂蚤蝇亚科其他属

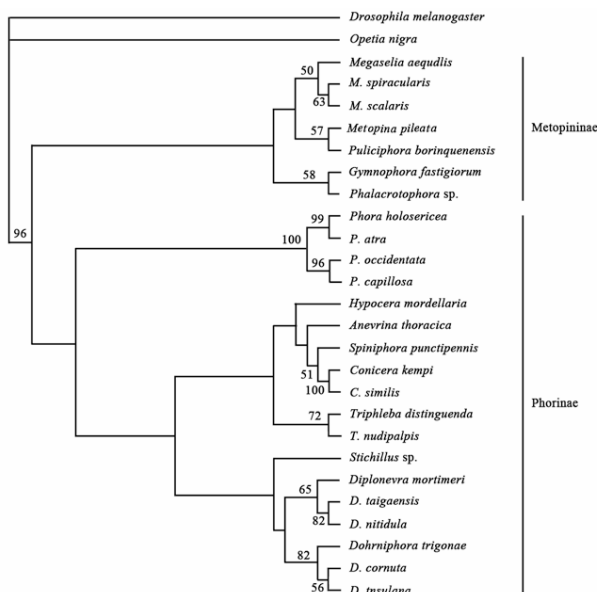


图 3 基于线粒体 12S rDNA 和 16S rDNA 部分序列构建的 MP 树

Fig. 3 MP tree derived from the concatenated sequences of mitochondrial 12S and 16S rDNA

各分支上的数字为系统树节点的置信度值。

The numbers above each branch indicate the MP bootstrap percentage.

不同,分子与形态特征都支持这两属具有有较近的亲缘关系。分子系统树显示寡蚤蝇属与伐蚤蝇属聚在一起,形态上两属也有相似之处,如前缘脉小于翅长二分之一并具有杜氏器,因而两者亲缘关系可能比较接近。

本文应用 12S rRNA 和 16S rRNA 基因序列对

中国蚤蝇科主要类群进行了系统发育研究,由不同方法构建的分子系统树拓扑结构基本一致,但类元取样和基因所含信息有限影响了分析结果。目前,利用分子数据对蚤蝇的研究还相当匮乏,本研究利用分子数据初步探讨了中国蚤蝇科的系统发育关系,为今后的进一步研究提供了参考。

参考文献:

- Brown BV. 1992. Generic revision of Phoridae of the Nearctic Region and phylogenetic classification of Phoridae, Sciadoceridae, and Ironomyiidae (Dipt.: Phoridae)[J]. *Mem Entomol Soc Can*, **164**: 1-144.
- Brown BV. 2004. Revision of the subgenus *Udamochiras* of *Melalocha* bee-killing flies. (Diptera: Phoridae: Metopininae)[J]. *Zool J Linn Soc*, **140**(1): 1-42.
- Cheng XY, Zhou HZ, Zhang GX. 2000. Perspective of molecular biological techniques applied in insect systematics[J]. *Acta Zootaxonom Sin*, **25**(2): 121-133. [成新跃, 周红章, 张广学. 2000. 分子生物学技术在昆虫系统学研究中的应用. 动物分类学报, **25**(2): 121-133.]
- Chen AH, Jiang GF. 2004. Phylogenetic relationships among 12 species of Tetrigidae (Orthoptera: Tetrigoidea) based on partial sequences of 12S and 16S ribosomal RNA[J]. *Zool Res*, **25**(6): 510-514. [陈爱辉, 蒋国芳. 2004. 基于线粒体 12S 和 16S rRNA 部分序列探讨蜚科 12 种的系统发育关系. 动物学研究, **25**(6): 510-514.]
- Cook CE, Austin JJ, Disney RHL. 2004. A mitochondrial 12S and 16S rRNA phylogeny of critical genera of the Phoridae (Diptera) and related families of Aschiza[J]. *Zootaxa*, **593**: 1-11.
- Disney RHL. 1991. Convergent and parallel evolution and the supra-generic classification of the Phoridae (Diptera) [J]. *G Ital Entomol*, **5**: 263-287.
- Disney RHL, Cumming MS. 1992. Abolition of Alamirinae and ultimate rejection of Wasmann's theory of hermaphroditism in Termitoxeniinae (Diptera: Phoridae) [J]. *Bonn Zool Beitr*, **43**: 145-154.
- Disney RHL. 1994. Continuing the debate relating to the phylogenetic reconstruction of the Phoridae (Diptera) [J]. *G Ital Entomol*, **7**: 103-117.
- Disney RHL. 2003. The dorsal abdominal glands and the higher classification of the Phoridae (Diptera) [J]. *Zootaxa*, **293**: 1-16.
- Han HY, Ro KE. 2009. Molecular phylogeny of the family Tephritidae (Insecta: Diptera): New insight from combined analysis of the mitochondrial 12S, 16S, and COII genes[J]. *Mol Cells*, **27**(1): 55-66.
- Hennig W. 1966. Phylogenetic Systematics[M]. Urbana: University of Illinois Press.
- Hennig W. 1973. Diptera (Zweiflügler) [M]// Helmcke JG, Starck D, Wermuth H. Handbuch der Zoologie IV. Berlin: Walter De Gruyter.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny[J]. *Bioinformatics*, **17**(8): 754-755.
- Kambhampati S, Smith PT. 1995. PCR primers for the amplification of four insect mitochondrial gene fragments[J]. *Insect Mol Biol*, **4**: 233-236.
- Kronforst MR, Folgarait PJ, Patrock RJW, Gilbert LE. 2007. Genetic differentiation between body size biotypes of the parasitoid fly *Pseudacteon obtusus* (Diptera: Phoridae) [J]. *Mol Phylogenet Evol*, **43**(3): 1178-1184.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. *Brief Bioinform*, **5**(2): 150-163.
- Liu GC. 2001. A Taxonomic Study of Chinese Phorid Flies Diptera: Phoridae: part 1 [M]. Shenyang: Northeastern University Press. [刘广纯. 2001. 中国蚤蝇分类: 上册[M]. 沈阳: 东北大学出版社.]
- Marquez JG, Cummings MA, Krasur ES. 2007. Phylogeography of stable fly (Diptera: Muscidae) estimated by diversity at ribosomal 16S and cytochrome oxidase I mitochondrial genes [J]. *J Med Entomol*, **44**(6): 998-1008.
- Nagaraja, Nagaraju J, Ranganath HA. 2004. Molecular phylogeny of the *nasuta* subgroup of *Drosophila* based on 12S rRNA, 16S rRNA and Col mitochondrial genes, RAPD and ISSR polymorphisms[J]. *Genes Genet Syst*, **79**(5): 293-299.
- Posada D, Crandall KA. 1998. Modeltest: Testing the model of DNA substitution[J]. *Bioinformatics*, **14** (9): 817-818.
- Rohacek J, Tothova A, Vanhara J. 2009. Phylogeny and affiliation of European Anthomyzidae (Diptera) based on mitochondrial 12S and 16S rRNA[J]. *Zootaxa*, **2054**: 49-58.
- Schmitz H. 1929. Revision der Phoriden [M]. Berlin und Bonn: Fred. Dummlers Verlag.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers[J]. *Ann Entomol Soc Am*, **87**: 651-701.
- Swofford DL. 2002. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods: beta version)[M]. Sunderland: Sinauer Associates.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The Clustal X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Res*, **24**: 4876-4882.
- Xia X, Xie Z. 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution[J]. *J Hered*, **92**: 371-373.