

星斑蛾蚋全线粒体基因组序列测定及分析*

闫俊** 陈汕 贾俊清 尤平***

(陕西师范大学生命科学院, 西安 710062)

摘要 【目的】蝇蛆病分布广泛, 是一类主要由双翅目昆虫的幼虫引发的寄生虫病。蛾蚋幼虫是毛蠓科昆虫中可引发人体蝇蛆病的最常见物种之一。星斑蛾蚋 *Psychoda alternata* 线粒体基因组全序列对研究这类致病昆虫的系统地位具有重要的意义, 也为预防和治疗蝇蛆病提供理论基础。【方法】本文利用 DNA 测序和克隆技术, 对星斑蛾蚋的线粒体基因组进行了初步研究。【结果】研究表明: 星斑蛾蚋线粒体基因组全长 15 908 bp, 由蛋白质编码基因、tRNA 基因、rRNA 基因和非编码 A+T 富含区构成。两条链 (J 链和 N 链) 共编码了 37 个基因。全序列碱基百分含量为 39.6% A, 40.3% T, 11.8% C, 8.3% G, 全基因组序列的 A+T 含量为 79.9%。【结论】星斑蛾蚋线粒体基因组组成和排序与典型的昆虫 mtDNA 一致。分布于 J 链的蛋白质基因有 9 种, 而 N 链上有 4 种, 其碱基含量在两条链上呈不对称现象不明显。基于线粒体 13 种蛋白质编码基因的 26 种双翅目昆虫系统发育分析表明毛蠓科与伪蚊科为姐妹群。

关键词 双翅目, 毛蠓科, 星斑蛾蚋, 线粒体基因组, 系统发育分析

Sequence analysis of the complete mitochondrial genome of *Psychoda alternata*

YAN Jun** CHEN Shan JIA Jun-Qing YOU Ping***

(College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract [Objectives] Myiasis is a widely distributed kind of parasitic disease mainly caused by fly larvae. *Psychoda alternata* is one of the most common species of psychodidae that can trigger human myiasis. Determining the complete mitochondrial genome of *P. alternata* is valuable for general molecular and evolutionary studies on the Diptera, as well as for providing a theoretical basis for the prevention and treatment of myiasis. [Methods] DNA sequencing and cloning technology were used to obtain the complete mitochondrial genome sequence of *P. alternata*. [Results] The complete mitochondrial genome contained 15 908 nucleotides, consisting of protein coding genes, tRNA genes, rRNA genes, and a non-coding A+T-rich region. Two strands, the J and N strands, transcribed 37 genes. Genomic base composition was A 39.6%, T 40.3%, C 11.8%, G 8.3%, and A+T content comprised 79.9%. [Conclusion] The genetic organization of the *P. alternata* mitochondrial genome sequence is consistent with that of typical insect mtDNA. The J strand transcribes 9 protein genes whereas the other 4 genes are distributed on the N strand. The phenomenon of A+T composition asymmetry was not obvious. Phylogenetic analyses based on 13 protein-coding genes from mitochondrial genomes in 26 dipteran species demonstrates that the Psychodidae and Tanyderidae are sister taxa.

Key words Diptera, Psychodidae, *Psychoda alternata*, mitochondrial genome, phylogenetic analyses

蛾蚋也被称为毛蠓或者蝶蝇, 隶属于双翅目
Diptera、毛蠓科 Psychodidae、毛蠓亚科

Psychodinae、毛蠓属 *Psychoda*, 是一种栖息于
人类居住地的昆虫。随着人类健康意识的提高,

*资助项目 Supported projects: 自然科学基金 (31372158)

**第一作者 First author, E-mail: yanjun@snnu.edu.cn

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: youping@snnu.edu.cn

收稿日期 Received: 2016-05-29, 接受日期 Accepted: 2016-08-04

被忽视的蝇蛆病近几年被广泛地报道(陆菁, 2012)。蛾蚋的幼虫可以引发人体蝇蛆病, 其成虫滋生于污秽场所, 也可能成为病原微生物的携带者。蛾蚋幼虫已经被报道可寄生于人体尿道、口腔等组织器官(王新彩和刘润芳, 2006; 王学东和蒋玲, 2015), 使患者精神状态差, 影响身心健康, 严重时可导致组织器官受损, 甚至引起死亡。此外, 蝇蛆病分布广泛, 有更多的病例报告来自热带、亚热带和温带地区, 如拉丁美洲、非洲、中东和亚洲(Johnston and Dickinson, 1996)以及 Yones 等(2014)报道的 5 例由蛾蚋幼虫引发的泌尿生殖系蝇蛆病。虽然目前我国的生活水平、环境卫生以及医疗技术得到了改善, 但这些双翅目昆虫对我们的危害还是不可避免的。因此, 我们对蛾蚋的研究, 可以为蛾蚋的防治以及相关疾病的探讨提供一些可供参考的资料。

由于动物线粒体基因组(mtDNA)在结构和进化上的特点, 它在科学研究中发挥的作用越来越突出。动物 mtDNA 由于基因组成稳定、母系遗传、进化速率快、低重组率以及便于获取等特征, 被普遍应用于起源进化、物种识别以及种群研究(Boore, 1999; Gissi *et al.*, 2008)。此外, 由于基因进化速率的不同, mtDNA 也可以为不同分类级别类群的亲缘关系研究提供各种分子标记, 促进了线粒体基因组的研究和发展。典型的昆虫 mtDNA 是一个环状 DNA 分子, 少数特例除外, 基因的种类、大小以及排序相对保守, 36 或 37 个基因紧密排列, 全序列的大小主要取决于 A+T 富含区。

星斑蛾蚋 *Psychoda alternata* 是毛蠓科中可以引发人体蝇蛆病的一个物种, 属于世界性分布昆虫, 可侵入室内, 滋生于下水道等污秽场所。至今, 在双翅目毛蠓科昆虫中, 仅有 3 个物种(*Phlebotomus chinensis*, *Phlebotomus papatasi*, *Nyssomyia umbratilis*)的 mtDNA 全序列被报道。本研究基于长 PCR 结合引物步移法确定了星斑蛾蚋 mtDNA 全序列, 对其基本特征进行了描述, 并且探讨了毛蠓科在双翅目系统发育中的地位, 拟为毛蠓科昆虫的科学研究和防治等应用研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料采集与保存

星斑蛾蚋采于西安市雁塔区民居, 保存于 95% 的酒精中。

1.2 DNA 的提取

取单个虫体, 利用天根微量 DNA 提取试剂盒提取总 DNA。DNA 样品保存于 -20℃ 冰箱中。

1.3 PCR 扩增

星斑蛾蚋的线粒体基因组利用表 1 所示的通用引物(Simon *et al.*, 2006)和特异性引物进行扩增。PCR 反应体系为 25 μ L, 包括 2.5 mmol/L $MgCl_2$, 2.5 μ L 10 $\times$ LA PCR 缓冲液, dNTP 0.4 mmol/L, 1.25 U LA Taq 聚合酶(Takara), 上下游引物各 0.4 μ mol/L, 45 ng DNA。扩增条件为: 93℃ 预变性 1 min, 共运行 40 个循环。每一循环包括: 92℃ 变性 10 s, 47~57℃ 退火 30 s, 60℃ 延伸 6 min, 最后一次循环后 72℃ 延伸 10 min。适当的调整温度和时间, 使扩增效果最优化。

1.4 序列拼接、注释及分析

使用 Staden Package v1.7.0 (Staden *et al.*, 2000)进行相邻序列的自动拼接, 并对拼接好的序列进行人工校正。利用 Clustal X (Thompson *et al.*, 1997)软件, 以其它双翅目昆虫的同源区域为基础, 确定蛋白质编码基因和 rRNA 基因。同时, 采用 tRNAscan-SE v1.21 (Lowe and Eddy, 1997)软件确定 tRNA 基因和它们可能的二级结构。Tandem Repeat Finder v4.07 (Benson, 1999)软件确定 A+T 富含区的串联重复片段。通过 MEGA v5.1 (Tamura *et al.*, 2011)软件进行碱基组成等参数的统计分析(李雪娟等, 2013)。

1.5 系统发育分析

本研究对来自双翅目的 25 个有代表性的物种和外群长翅目的 *Bittacus pilicornis* (表 2)进行了系统发育分析。将线粒体 13 种蛋白质编码基因的序列进行比对, 然后进行序列转换。利用

表 1 长 PCR 扩增引物
Table 1 List of L-PCR primers

引物名字 Primer name	序列 Sequence (5'→3')	位置 Position	退火温度 Temperature (°C)
1F	ATAATAGGGTATCTAATCCTAGT	14375-14397	51
1R	ACCTTTATAAATGGGGTATGAGCC	160-183	57
2F	GCCTGATTAAAGGGTATCTTGATA	9-34	55
2R	TATACTTCTGGATGACCAAAAAATCA	2109-2134	51
3F	AATTGGTGGATTGGAAGCTG	1625-1645	52
3R	CCACAAATTTCTGAACATTG	3595-3614	49
4F ^a	CCCAGCTTTAGGAGTAAAGATT	3507-3528	48
4R	ATCTACAAAATGTCAATATCA	5390-5409	47
5F	GTTGATTATAGCCCATGACC	4703-4722	52
5R ^a	GCTTTTAAAGAGCATTACATTGAAG	6235-6259	50
6F	TTTAATTGAAACCAAAAAGAGG	6009-6027	50
6R	AAGTCTTTAATTGCTTATTCTTC	8566-8588	48
7F	CCAGAAGAACATAAGCCATG	8461-8480	53
7R	TGTCAACAGCGAAGCCTCCTCA	10848-10869	53
8F ^a	TTCATATTGATGAACTTTGGATC	10436-10459	54
8R	GTTGCTTTTTTAACCTTATTAGAACG	12418-12443	53
9F	AACTTCATAAGAAATAGTTTGAGC	12060-12083	57
9R	GTGCCAGCTACTGCGTTATAC	14536-14557	62

^a 特异性引物 Specific primers.

表 2 系统发育分析中涉及的物种及 GenBank 登录号
Table 2 The species and their GenBank accession numbers used in the phylogenetic analyses

种类 Species	科 Family	登录号 Accession number	文献 Reference
<i>Psychoda alternata</i>	Psychodidae	KU994885	本研究 This study
<i>Phlebotomus chinensis</i>	Psychodidae	KR349297	Ye <i>et al.</i> , 2015
<i>Phlebotomus papatasi</i>	Psychodidae	KR349298	Ye <i>et al.</i> , 2015
<i>Lutzomyia umbratilis</i>	Psychodidae	KP702938	Kocher <i>et al.</i> , 2015
<i>Trichocera bimacula</i>	Trichoceridae	JN861750	Beckenbach, 2012
<i>Paracladura trichoptera</i>	Trichoceridae	JN861751	Beckenbach, 2012
<i>Protoplasia fitchii</i>	Tanyderidae	JN861746	Beckenbach, 2012
<i>Tipula abdominalis</i>	Tipulidae	JN861743	Beckenbach, 2012
<i>Ptychoptera sp.</i>	Ptychopteridae	JN861744	Beckenbach, 2012
<i>Bittacomorphella fenderiana</i>	Ptychopteridae	JN861745	Beckenbach, 2012
<i>Chironomus tepperi</i>	Chironomidae	JN861749	Beckenbach, 2012
<i>Culicoides arakawae</i>	Ceratopogonidae	AB361004	Matsumoto <i>et al.</i> , 2009
<i>Anopheles gambiae</i>	Culicidae	NC-002084	Beard <i>et al.</i> , 1993
<i>Aedes albopictus</i>	Culicidae	AY072044	未发表资料 Unpublished data
<i>Culex pipiens</i>	Culicidae	NC-015079	未发表资料 Unpublished data
<i>Cramptonomyia spenceri</i>	Pachyneuridae	JN861747	Beckenbach, 2012

续表 2 (Table 2 continued)

种类 Species	科 Family	登录号 Accession number	文献 Reference
<i>Arachnocampa flava</i>	Keroplatidae	JN861748	Beckenbach, 2012
<i>Sylvicola fenestralis</i>	Anisopodidae	JN861752	Beckenbach, 2012
<i>Cydistomyia duplonotata</i>	Tabanidae	DQ866052	Cameron <i>et al.</i> 2007
<i>Ceratitis capitata</i>	Tephritidae	NC-000857	Spanos <i>et al.</i> , 2000
<i>Simosyrphus grandicornis</i>	Syrphidae	DQ866050	Cameron <i>et al.</i> 2007
<i>Cochliomyia hominivorax</i>	Calliphoridae	AF260826	Lessinger <i>et al.</i> , 2000
<i>Dermatobia hominis</i>	Oestridae	AY463155	unpublished data
<i>Drosophila yakuba</i>	Drosophilidae	NC-001322	Clary <i>et al.</i> , 1982
<i>Haematobia irritans</i>	Muscidae	DQ029097	未发表资料 Unpublished data
<i>Bittacus pilicornis</i>	Bittacidae	NC-015118	Beckenbach, 2011

jModelTest (Posada, 2008) 评估构建系统发育关系的最优模型。用 MrBayes ver.3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) 和 RAxML ver.7.2.8 (Stamatakis *et al.*, 2005) 软件分别构建最大似然 (ML) 和贝叶斯推理 (BI) 的系统发育关系。

2 结果与分析

2.1 星斑蛾蚋 mtDNA 基因组结构

星斑蛾蚋线粒体基因组为典型双链闭合环状 DNA 分子 (图 1), 其全序列长 15 908 bp, 比 *Phlebotomus papatasi* (15 557 bp) 长 351 bp, 比 *Phlebotomus chinensis* (16 277 bp) 短 369 bp。该序列已提交 GenBank 数据库, 序列号为 KU994885。基因组成 (表 3) 与已经公布的双翅目昆虫 mtDNA 相同, 其两条链都参与了基因的编码, J 链中编码了 23 种基因, N 链编码了其余的 14 种基因 (表 3), 基因排序与昆虫原始基因排序相一致。

2.2 星斑蛾蚋 mtDNA 各碱基含量

各碱基在全序列中的百分含量分别为: 40.3% T, 11.8% C, 39.6% A, 8.3% G。A+T 含量为 79.9%, 具有显著的 A+T 偏好性。J 链中的蛋白质编码基因 A、T 含量分别为 32.9% 和 43.6%, 而 N 链分别为 32.6% 和 47.5%。在密码子方面, 3 个位点 A+T 含量分别为 93.1% (第 3 位点) > 71.5% (第 1 位点) > 69.2% (第 2 位

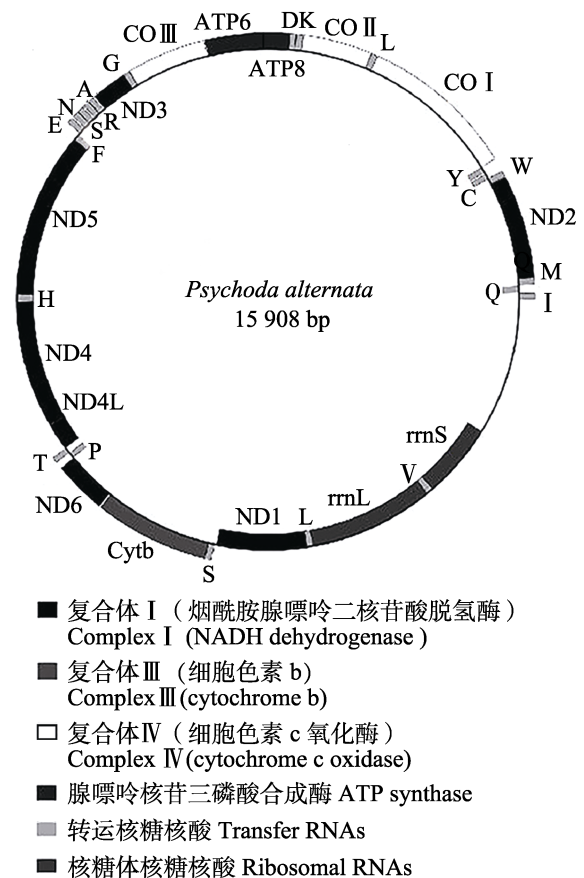


图 1 星斑蛾蚋线粒体 DNA 基本结构图
Fig. 1 Circular map of mitochondrial genome of *Psychoda alternate*

点), 这是昆虫线粒体基因组普遍存在的现象。

2.3 蛋白质编码基因的特征分析

编码蛋白质的序列区域大小为 11 166 bp。

表 3 星斑蛾蚋 mtDNA 的基因组成特征
Table 3 The organization of the mitochondrial genome of *Psychoda alternata*

基因 Gene	位置 Position	编码链 Strand	起始密码子 Start codon	终止密码子 Stop codon	反义密码子 Anticodon
tRNA-Ile	1-67	J			GAT
tRNA-Gln	67-135	N			TTG
tRNA-Met	134-201	J			CAT
ND2	202-1210	J	ATT	T	
tRNA-Trp	1211-1278	J			TCA
tRNA-Cys	1277-1339	N			GCA
tRNA-Tyr	1340-1404	N			GTA
COI	1410-2948	J	TTG	TAA	
tRNA-Leu-UUR	2944-3008	J			TAA
COII	3013-3702	J	ATG	TAA	
tRNA-Lys	3705-3775	J			CTT
tRNA-Asp	3775-3839	J			GTC
ATP8	3840-4010	J	ATC	TAA	
ATP6	4004-4669	J	GTG	TAA	
COIII	4673-5458	J	ATG	TAA	
tRNA-Gly	5469-5532	J			TCC
ND3	5533-5884	J	ATT	T	
tRNA-Ala	5885-5947	J			TGC
tRNA-Arg	5947-6009	J			TCG
tRNA-Asn	6007-6074	J			GTT
tRNA-Ser-AGN	6076-6139	J			TCT
tRNA-Glu	6141-6205	J			TTC
tRNA-Phe	6204-6268	N			GAA
ND5	6269-7997	N	ATT	T	
tRNA-His	7998-8062	N			GTG
ND4	8063-9398	N	ATG	T	
ND4L	9398-9685	N	ATG	TAA	
tRNA-Thr	9692-9757	J			TGT
tRNA-Pro	9758-9822	N			TGG
ND6	9825-10352	J	ATT	TAA	
Cytb	10356-11489	J	ATG	TAA	
tRNA-Ser-UCN	11492-11557	J			TGA
ND1	11575-12512	N	TTG	TA	
tRNA-Leu-CUN	12513-12576	N			TAG
LrRNA	12577-13875	N			
tRNA-Val	13876-13944	N			TAC
SrRNA	13945-14729	N			
A+T-rich 区	14730-15908				

表 4 PCGs 密码子的使用情况
Table 4 Codon usage for PCGs

密码子 Codon	数值 Count	同义密码子相对使用度 RSCU	密码子 Codon	数值 Count	同义密码子相对使用度 RSCU
UUU(F)	347	1.85	UAU(Y)	166	1.89
UUC(F)	28	0.15	UAC(Y)	10	0.11
UUA(L)	470	4.97	UAA(*)	0	0
UUG(L)	14	0.15	UAG(*)	0	0
CUU(L)	63	0.67	CAU(H)	62	1.75
CUC(L)	1	0.01	CAC(H)	9	0.25
CUA(L)	18	0.19	CAA(Q)	59	1.84
CUG(L)	1	0.01	CAG(Q)	5	0.16
AUU(I)	400	1.95	AAU(N)	206	1.82
AUC(I)	11	0.05	AAC(N)	20	0.18
AUA(M)	228	1.77	AAA(K)	70	1.41
AUG(M)	30	0.23	AAG(K)	29	0.59
GUU(V)	92	2.06	GAU(D)	55	1.64
GUC(V)	7	0.16	GAC(D)	12	0.36
GUA(V)	77	1.72	GAA(E)	71	1.92
GUG(V)	3	0.07	GAG(E)	3	0.08
UCU(S)	112	2.64	UGU(C)	38	1.90
UCC(S)	7	0.17	UGC(C)	2	0.10
UCA(S)	86	2.03	UGA(W)	87	1.93
UCG(S)	2	0.05	UGG(W)	3	0.07
CCU(P)	84	2.73	CGU(R)	6	0.47
CCC(P)	2	0.07	CGC(R)	0	0
CCA(P)	36	1.17	CGA(R)	44	3.45
CCG(P)	1	0.03	CGG(R)	1	0.08
ACU(T)	84	2.17	AGU(S)	23	0.54
ACC(T)	4	0.10	AGC(S)	1	0.02
ACA(T)	65	1.68	AGA(S)	107	2.53
ACG(T)	2	0.05	AGG(S)	1	0.02
GCU(A)	85	2.39	GGU(G)	41	0.80
GCC(A)	10	0.28	GGC(G)	12	0.23
GCA(A)	44	1.24	GGA(G)	129	2.52
GCG(A)	3	0.08	GGG(G)	23	0.45

ATP8 和 ATP6 之间的重叠片段为 7 bp, 在 *Phlebotomus chinensis* 和 *Phlebotomus papatasi* 中也存在这种情况, 这是长角亚目线粒体基因组普

遍的现象。10 种基因 (表 3) 的起始密码子采用了典型的 ATN, 而有 3 种采用了特殊 GTG 和 TTG。对于终止子, 8 种基因 (表 3) 采用了典

型的 TAA, 5 种基因采用了常见的 T 和 TA。根据氨基酸组成情况和密码子使用情况的统计(表 4), 出现次数较多的氨基酸有: 亮氨酸 (15.27%), 异亮氨酸 (11.07%), 苯丙氨酸 (10.10%), 甲硫氨酸 (6.95%); 使用最为频繁的密码子有: UUA (亮氨酸), AUU (异亮氨酸), UUU (苯丙氨酸), AUA (甲硫氨酸)。

2.4 tRNA 和 rRNA 结构分析

tRNA 基因的排列顺序与其他昆虫一致, 只

有 Ser 和 Leu 各对应 2 个 tRNA, 用于运载 20 种氨基酸, 序列大小在 63~71 bp 之间。22 个 tRNA 中只有 tRNA-Ser (AGN) 缺失 D 臂, 没有折叠组装成三叶草结构(图 2), 这与其他昆虫 mtDNA 的 tRNA 二级结构特征相一致。绝大多数 tRNA 反密码子的使用与其他长角亚目物种线粒体基因组一致, 但 tRNA-Ser (AGN) 以 TCT 为反密码子代替了常见的 GCT。

星斑蛾蚋的 rRNA 基因与其他昆虫一致, 高度保守, 可分为 2 个基因, 均以单拷贝的形式存

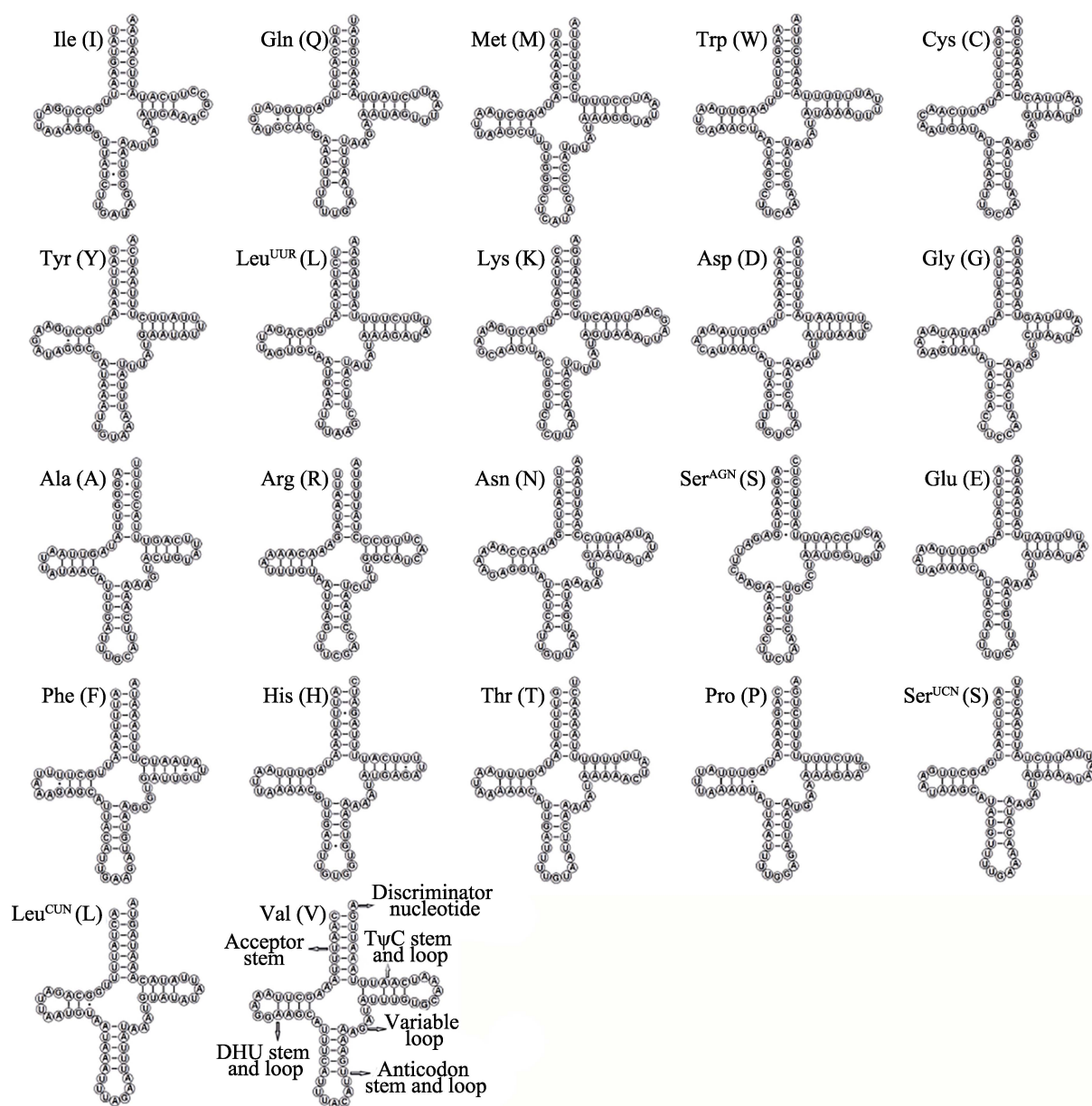


图 2 星斑蛾蚋 tRNA 三叶草结构预测图

Fig. 2 The inferred secondary structures of mitochondrial tRNA genes of *Psychoda alternata*

在, 一个较大的 16S rRNA 基因长度为 1 299 bp, 较小的 12S rRNA 基因长度为 785 bp。rRNA 基因的 A+T 含量可达到 82.5%。

2.5 A+T 富含区

星斑蛾蚋线粒体基因组非编码 A+T 富含区的序列长度为 1 180 bp, 而 *Phlebotomus chinensis* 和 *Phlebotomus papatasi* 分别为 1 432 bp 和 723 bp, 是决定基因组大小的主要因素。该区域 AT 两种碱基的含量非常丰富, 可达到 93.8%, 明显高于全序列水平 (79.9%)。在该 A+T 富含区内出现了以 218 bp 为单位的重复片段, 拷贝数为 4.2, 但重复片段中发生了少数的基因缺失、插入和替换。其余 269 bp 的非重复序列可能参与了与 mtDNA 复制及转录相关的调控过程。

2.6 系统发育分析

双翅目在传统分类上由长角亚目和短角亚目构成, 长期以来的系统发育研究证实, 长角亚目被普遍认为是并系群。在本研究中, 基于 13 种蛋白质编码基因的第一、二位密码子, 利用 ML 分析和 BI 分析推断系统发育关系, 得到了相似的拓扑结构 (图 3)。短角亚目形成一个单系群, 大蚊科位于双翅目的基部, 而褶蚊科与东大蚊科聚为一支。毛蠓科的物种与 *Protoplasma fitchii* (伪蚊科) 聚为一支, 而且具有较高的支持度 (ML 自举值为 100% 和 BI 分析中贝叶斯后验概率 (BBP) 为 1)。毛蠓科与伪蚊科包含于蚊次目, 但该分支节点仅有较弱的支持度 (ML 自举值为 <50%, BBP 值为 0.79), 这表明该分支与蚊次目的关系不能确定, 需要进一步研究证实。

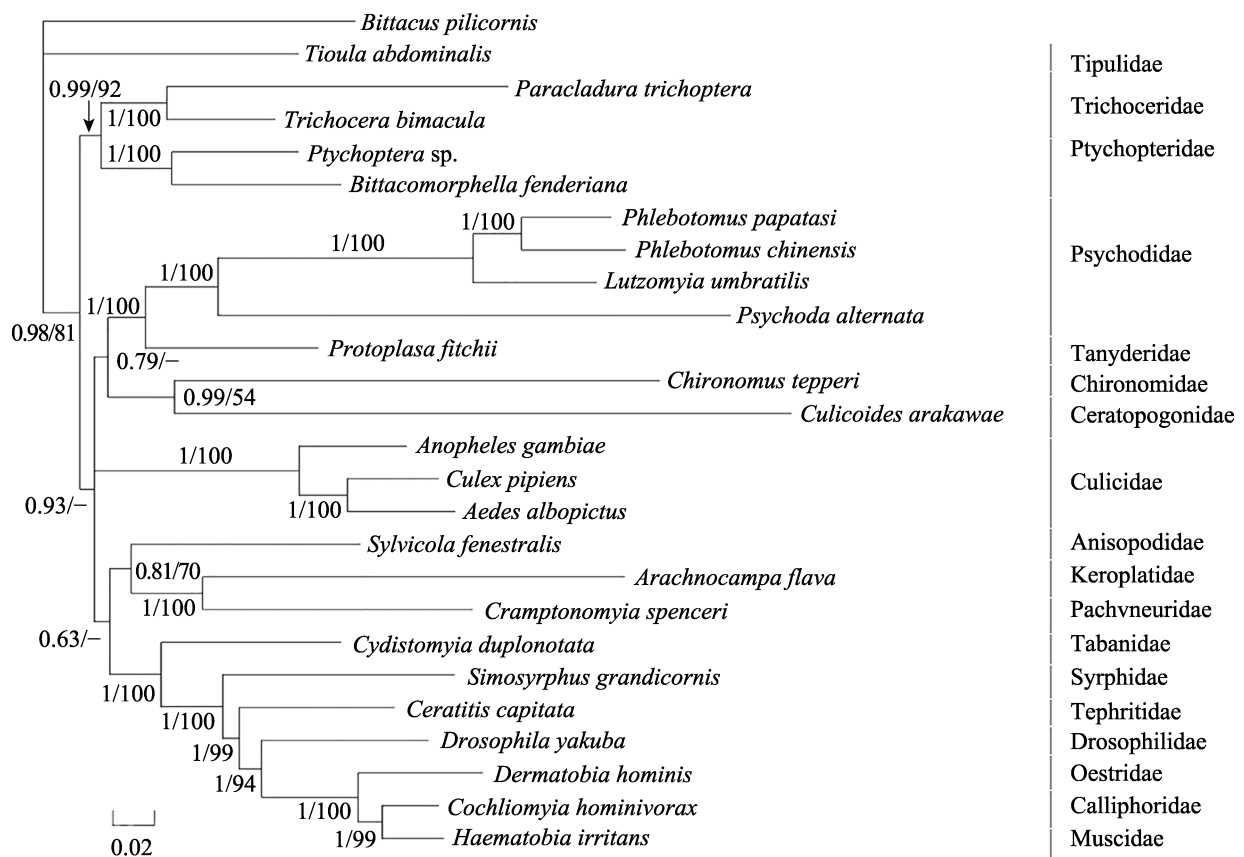


图 3 基于 mtDNA 蛋白质编码基因的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of mitochondrial PCGs gene sequences

分支上的第一个数值代表 BI 分析的 BBP 值, 第二个数值代表 MI 分析的自举值。

First values at the branches indicate Bayesian posterior probabilities while the second values correspond to ML bootstrap support in percentages.

3 讨论

在双翅目昆虫 mtDNA 中,分布在 J 链和 N 链的蛋白质基因的碱基组成出现了显著的差异,AT 两种碱基的百分比呈不对称分布(梅琰等,2012)。但在星斑蛾蚋中,这种不对称分布的现象却不明显,而且 *Phlebotomus chinensis* 和 *Phlebotomus papatasi* 也存在类似的情况。tRNA 基因中存在 23 对非 Watson-Crick 的错配碱基,其中 G-U 错配 13 对,这种现象也存在于其它昆虫的线粒体基因组,表明 G-U 错配可能是昆虫 mtDNA 中正常的碱基配对形式(周志军等,2011)。

本文以来自双翅目有代表性的 26 种昆虫 mtDNA 蛋白质编码基因的序列为数据,探究了双翅目类群间的进化关系。虽然长角亚目传统上被普遍视为是并系群,该亚目群体之间在生物进化和生物起源上的关系不是十分确定。来自长角亚目物种新测线粒体基因组数据的补充,可能对长角亚目类群间进化关系的探讨产生积极的作用。本研究与 Ye 等(2015)得到的毛蠓科系统发育地位相同,并且与依据其它分子数据得出的结果也是一致的(Bertone *et al.*, 2008; Wiegmann *et al.*, 2011)。王诗迪等(2012)在双翅目昆虫系统学研究中提出核基因(18S rRNA、28S rRNA 等)对于系统发育问题的研究具有重要意义。在今后的研究工作中,结合核基因和线粒体基因,需对双翅目昆虫的系统进化做进一步的研究。

目前,蛾蚋的分类以形态学特征为主要鉴定依据,但形态相似的物种仍难以区分。分子数据可以作为物种识别的补充信息(葛振萍等,2007)。利用传统的分类学,结合分子系统学,研究物种的分类和系统地位,可以得出更加科学的结论。双翅目昆虫包含大量病媒昆虫和农林害虫,分子生物学手段的迅速发展对于物种的快速识别和准确鉴定有重要指导意义。因此,以线粒体基因组以及 DNA 操作技术的研究手段,可补充和完善疾病防控和害虫防治的传统方法。然而,双翅目毛蠓科昆虫的线粒体基因组序列的已

知信息有限,目前 GenBank 仅见 4 种(包括星斑蛾蚋),限制了蛾蚋的分子进化研究。动物 mtDNA 已经被认为是一种良好的生物学研究对象,普遍地应用于物种鉴定以及种群系统发育等方面的研究。昆虫中使用比较频繁的分子标记有 CO₁、CO₂、12S RNA 和 16S RNA(王备新等,2002)。虽然随着 DNA 测序技术的不断更新和进步,昆虫 mtDNA 的研究也成为当今热点之一,但仍然有大量的类群因缺乏数据而限制了分子系统学的研究。因此,昆虫 mtDNA 的分子数据库仍需要进一步修正和补充。

参考文献 (References)

- Beard CB, Hamm DM, Collins FC, 1993. The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. *Insect Molecular Biology*, 2(2): 103–124.
- Beckenbach AT, 2011. Mitochondrial genome sequences of representatives of three families of scorpionflies (Order Mecoptera) and evolution in a major duplication of coding sequence. *Genome*, 54(5): 368–376.
- Beckenbach AT, 2012. Mitochondrial genome sequences of Nematocera (lower Diptera): evidence of rearrangement following a complete genome duplication in a winter crane fly. *Genome Biology Evolution*, 4(2): 89–101.
- Benson G, 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 27(2): 573–580.
- Bertone MA, Courtney GW, Wiegmann BM, 2008. Phylogenetics and temporal diversification of the earliest true flies (Insecta: Diptera) based on multiple nuclear genes. *Systematic Entomology*, 33: 668–687.
- Boore JL, 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, 27(8): 1767–1780.
- Cameron SL, Lambkin CL, Barker SC, Whiting MF, 2007. A mitochondrial genome phylogeny of Diptera: whole genome sequence data accurately resolve relationships over broad timescales with high precision. *Systematic Entomology*, 32(1): 40–59.
- Clary DO, Goddard JM, Martin SC, Fauron CM, Wolstenholme DR, 1982. *Drosophila* mitochondrial DNA: a novel gene order. *Nucleic Acids Research*, 10(21): 6619–6637.
- Ge ZP, Liu JY, Zhang CT, 2007. Progress of Studies on Molecular Systematics of Flies (Diptera). *Journal of Shenyang Normal University (Natural Science Edition)*, 25(2): 233–236. [葛振萍, 刘家宇, 张春田, 2007. 双翅目蝇类的分子系统学研究进展. 沈阳师范大学学报(自然科学版), 25(2): 233–236.]
- Gissi C, Iannelli F, Pesole G, 2008. Evolution of the mitochondrial

- genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity*, 101(4): 301–320.
- Johnston M, Dickinson G, 1996. An unexpected surprise in a common boil. *Journal of Emergency Medicine*, 14(6): 779–781.
- Kocher A, Gantier JC, Holota H, Jeziorski C, Coissac E, Banuls AL, Girod R, Gaborit P, Muriene I, 2015. Complete mitochondrial genome of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *umbratilis* (Diptera: Psychodidae), the main vector of *Leishmania guyanensis*. *Mitochondrial DNA*, doi: 10.3109/19401736.2015.1022748.
- Lessinger AC, Martins Junqueira AC, Lemos TA, Kemper EL, Da Silva FR, Vettore AL, Arruda P, Azeredo-Espin AM, 2000. The mitochondrial genome of the primary screwworm fly *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Insect Molecular Biology*, 9(5): 521–529.
- Li XJ, Yang J, Wang JH, Ren QL, Li X, Huang Y, 2013. Methods and software tools for mitochondrial genome assembly and annotation. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(1): 298–304. [李雪娟, 杨婧, 王俊红, 任倩俐, 李霞, 黄原, 2013. 线粒体基因组数据的分析方法和软件. 应用昆虫学报, 50(1): 298–304.]
- Lowe TM, Eddy SR, 1997. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Research*, 25(5): 955–964.
- Lu J, 2012. A comprehensive analysis of 342 human myiasis cases in China during 1999–2010. *International Journal of Medical Parasitic Diseases*, 9(1): 56–59. [陆菁, 2012. 1999 至 2010 年我国 342 例人体蝇蛆病病例综合分析. 国际医学寄生虫病杂志, 9(1): 56–59.]
- Matsumoto Y, Yanase T, Tsuda T, Noda H, 2009. Species-specific mitochondrial gene rearrangements in biting midges and vector species identification. *Medical & Veterinary Entomology*, 23(23): 47–55.
- Mei Y, Yue QY, Jia FL, 2012. Research progress on mitochondrial genomes of Dipteral insect. *Journal of Environmental Entomology*, 34(4): 497–503. [梅琰, 岳巧云, 贾凤龙, 2012. 双翅目昆虫线粒体基因组研究进展. 环境昆虫学报, 34(4): 497–503.]
- Ronquist F, Huelsenbeck JP, 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12): 1572–1574.
- Posada D, 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology & Evolution*, 25: 1253–1256.
- Simon C, Buckley TR, Frati F, Stewart JB, Beckenbach AT, 2006. Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 37(1): 545–579.
- Spanos L, Koutroumbas G, Kotsyfakis M, Louis C, 2000. The mitochondrial genome of the Mediterranean fruitfly *Ceratitis capitata*. *Insect Molecular Biology*, 9(2): 139–144.
- Staden R, Beal KF, Bonfield JK, 2000. The staden package, 1998. *Methods in Molecular Biology*, 132: 115–130.
- Stamatakis A, Ludwig T, Meier H, 2005. RAxML-III: a fast program for maximum likelihood-based inference of large phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 21(4): 456–463.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology & Evolution*, 28(10): 2731–2739.
- 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. *Nucleic Acids Research*, 25(24): 4876–4882.
- Wang BX, Yang LF, 2002. Phylogenetic utilities of mitochondrial DNA sequences in the study of insect systematics. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 39(2): 88–92. [王备新, 杨莲芳, 2002. 线粒体 DNA 序列特点与昆虫系统学研究. 应用昆虫学报, 39(2): 88–92.]
- Wang SD, Zhao Z, Zhang CT, 2012. Advances in systematics of Diptera based on nuclear genes. *Journal of Environmental Entomology*, 34(1): 220–228. [王诗迪, 赵喆, 张春田, 2012. 常用核基因序列在双翅目昆虫系统学中的研究进展. 环境昆虫学报, 34(1): 220–228.]
- Wang XC, Liu RF, 2006. Psychoda larvae in urine of a woman. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 24(4): 256–256. [王新彩, 刘润芳, 2006. 人体尿内发现毛蠓幼虫 1 例. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 24(4): 256–256.]
- Wang XD, Jiang L, 2015. A case infected with Psychoda larva. *China Tropical Medicine*, 15(10): 1276–1277. [王学东, 蒋玲, 2015. 毛蠓幼虫感染 1 例. 中国热带医学, 15(10): 1276–1277.]
- Wiegmann BM, Trautwein MD, Winkler IS, Barr NB, Kim JW, Lambkin C, Bertone MA, Cassel BK, Bayless KM, Heimberg AM, Wheeler BM, Peterson KJ, Pape T, Sinclair BJ, Skevington JH, Blagoderov V, Caravas J, Kutty SN, Schmidt-Ott U, Kampmeier GE, Thompson FC, Grimaldi DA, Beckenbach AT, Courtney GW, Friedrich M, Meier R, Yeates DK, 2011. Episodic radiations in the fly tree of life. *Proceedings of the National Academy Sciences of the USA*, 108(14): 5690–5695.
- Ye F, Liu T, King SD, You P, 2015. Mitochondrial genomes of two phlebotomine sand flies, *Phlebotomus chinensis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Nematocera), the first representatives from the family Psychodidae. *Parasites & Vectors*, 8: 472.
- Yones DA, Bakir HY, Hameed DA, 2014. Human urogenital myiasis caused by psychoda species larvae: report of five cases and morphological studies. *The Journal of Advances in Parasitology*, 1(2): 12–20.
- Zhou ZJ, Shang N, Huang Y, Shi FM, Wei SZ, 2011. Sequencing and analysis of the mitochondrial genome of *Conocephalus maculatus* (Orthoptera: Conocephalinae). *Acta Entomologica Sinica*, 54(5): 548–554. [周志军, 尚娜, 黄原, 石福明, 韦仕珍, 2011. 斑翅草螽线粒体基因组序列测定与分析. 昆虫学报, 54(5): 548–554.]