蓟马科部分种类 mtDNA-COⅠ序列变异及系统发育分析*

沈登荣[1, 2**] 宋文菲[3] 袁盛勇[1] 田学军[1] 和绍禹[4] 张宏瑞[2***]

（1. 红河学院生命科学与技术学院 云南蒙自 661100；2. 云南农业大学植物保护学院 昆明 650201；
3. 云南省农业科学院蚕桑蜜蜂研究所 云南蒙自 661101；4. 云南农业大学东方蜜蜂研究所 昆明 650201）

摘 要 **【目的】** 蓟马科是一类重要的经济昆虫，目前一些种类的传统形态系统分类还存在争议，本研究采用分子标记对蓟马科的系统发育进行探讨。**【方法】** 对蓟马科 9 属 27 种蓟马的 mtDNA-COⅠ基因的变异进行分析，采用邻接法、最大似然法和贝叶斯法构建系统发育树。**【结果】** 研究表明在比对的 432 bp 的序列中，有 207 个保守位点，222 个变异位点，3 个缺失位点，序列 A+T 含量为 68.3%，具有 A、T 偏倚性；蓟马种间的序列分歧度变化在 15.6~40.0 之间。**【结论】** 系统进化树支持针蓟马亚科为蓟马科最为原始的类群；棍蓟马亚科与绢蓟马亚科、蓟马亚科形成姐妹群；绢蓟马亚科与蓟马亚科有较近的亲缘关系，支持 Mound 四亚科的分类系统。

关键词 蓟马科，系统发育，mtDNA-COⅠ，亲缘关系

Phylogenetic analysis of some Thripidae species based on sequence variation in the mtDNA-COⅠsegment

SHEN Deng-Rong[1, 2**] SONG Wen-Fei[3] YUAN Sheng-Yong[1] TIAN Xue-Jun[1]
HE Shao-Yu[4] ZHANG Hong-Rui[2***]

(1. College of Life Science and Technology of Honghe University, Mengzi 661100, China;
2. Plant Protection College, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;
3. Sericultural and Apicultural Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Mengzi, 661101, China;
4. Eastern Bee Research Institute of Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract **[Objectives]** The Thripidae consists of a lot of economically important insect pests. At present, the traditional morphological classification system remains controversial with respect to some species. In this paper, the phylogeny of Thripidae was investigated using molecular markers. **[Methods]** Sequence variation in the mtDNA-COⅠ gene of 9 genera and 27 species in the Thripidae was analyzed. Phylogenetic trees were constructed with Neighbor-Joining, maximum likelihood and Bayesian methods. **[Results]** The results show that there were 207 conservative sites, 222 variable sites and 3 missing loci in the 432 bp sequence analysed. The percentage of A+T was 68.3%. Sequence divergence among species ranged from 15.6 to 40.0. **[Conclusion]** The phylogenetic tree supports the hypotheses that the Panchaetothripinae are a relatively primitive group, the Dendrothripinae, Sericothripinae and Thripinae are a sister group, and that the Sericothripinae and

* 资助项目：农业部公益性行业科研专项项目（201103026, 200803025）；云南省教育厅科学研究基金重点项目（2013Z148）；红河学院植物保护硕士点建设项目；红河学院云南省高校农作物优质高效栽培与安全控制重点实验室项目

**E-mail: ynshdr@126.com

***通讯作者，E-mail: hongruizh@126.com

收稿日期：2013-07-08，接受日期：2013-10-12

Thripinae have a close genetic relationship. This supports Mound's four subfamilies classification system.

Key words Thripidae, phylogeny, mtDNA-CO Ⅰ, genetic relationship

蓟马科（Thripidae）隶属缨翅目（Thysanoptera），锯尾亚目（Terebrantia），是一类重要的经济昆虫。蓟马科包括约 326 属 2 060 余种，少数捕食性，多数食叶或在花中活动（Mound and Mossis, 2007）。目前国内外对蓟马科的系统分类还存在争议，国外主要采用 Mound 和 Mossis（2007）的分类系统，将蓟马科分为 4 个亚科，即针蓟马亚科（Panchaetothripinae）、棍蓟马亚科（Dendrothripinae）、绢蓟马亚科（Sericothripinae）和蓟马亚科（Thripinae）。国内主要采用韩运发（1997）的分类系统，蓟马科分为两个亚科，即针蓟马亚科和蓟马亚科，将棍蓟马亚科和绢蓟马亚科降为棍蓟马族（Dendrothripini）和绢蓟马族（Sericothripini），归入蓟马亚科中。

由于蓟马的个体微小，可供比较的形态特征有限，因此分类系统还存在许多争议（Morris and Mound, 2003）。基于 PCR 技术的分子鉴定，有效地弥补了传统形态鉴定的诸多不足。目前，mtDNA 已在缨翅目种类的识别和鉴定中得到广泛应用。研究发现 mtDNA-CO Ⅰ基因可实现未知蓟马种类的鉴定（Brunner *et al.*, 2002; 游中华等, 2007; Karimi *et al.*, 2010; 魏书军等, 2010; 乔玮娜等, 2012）。此外 mtDNA-CO Ⅰ基因还用于研究缨翅目亚目、科的系统发育、隐存种和种内分化（Crespi *et al.*, 1996; Morris and Mound, 2003; Toda and Murai, 2007; Rugman-Jones *et al.*, 2010）。本研究对蓟马科 9 属 27 种蓟马的 mtDNA-CO Ⅰ基因片段的变异分析，构建系统发育树，旨在为蓟马科的系统分类提供分子生物学方面的证据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究中蓟马种类的采集时间、采集地点、寄主、测序个体数及 GenBank 登录号见表 1。野外采集的标本用 75%酒精保存，带回实验室进行初步的形态鉴定后放入 95%酒精中，–20℃冰箱保存备用。

1.2 基因组 DNA 的提取

参照张利娟等（2011）的方法，部分步骤有改进。（1）将用无菌微针刺穿过的蓟马放入装有 40 μL STE 缓冲液（0.1 mol/L NaCl，0.01 mol/L Tris-HCl，0.001 mol/L EDTA，pH 8）的 0.2 mL 的离心管中。（2）加入 3 μL 的蛋白酶 K（20 mg/mL），而后 3 000 r/min 离心 1 min。（3）58℃水浴 3~4 h，水浴过程中每隔 1 h 拿出来混匀一次。（4）水浴结束后，将样品放入 PCR 扩增仪进行蛋白酶的灭活，95℃变性 5 min。（5）3 000 r/min 简单离心 1 min，4℃保存备用。每种蓟马检测 6~15 头，如出现多个单倍型，则选取出现频率最高的进行分析。

1.3 PCR 扩增及测定

采用 Brunner 等（2002）报道的引物，引物为：mtD7.2F：5′-ATTAGGAGCHCCHGAYATAGCATT-3′，mtD9.2R：5′-CAGGCAAGATTAAAATATAAACTTCTG-3′。扩增反应体系为 50 μL，体系包括：2 μL DNA 模板、5 μL l0×Buffer（$MgC1_2$ 1.5 mmol/L）、4 μL dNTPs（2.5 mmol/L），0.5 μL *Taq* DNA 聚合酶（5 U/μL）（大

连宝生物，TaKaRa），上下游引物各 1.0 μL（10 pmol/μL），加灭菌双蒸水至 50 μL。PCR 步骤如下：94℃预变性 5 min； 94℃变性 40 s，55℃退火 l min，72℃延伸 l min，共 35 个循环；72℃后延伸 10 min，4℃保存。扩增产物用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。所得目的片段的测序由上海生工生物工程有限公司完成，测序反应在 ABI 3730XL 测序仪上进行。

1.4　mtDNA-CO Ⅰ序列变异分析

所测得的 mtDNA-CO Ⅰ基因序列用 Seqman 进行拼接并辅以人工矫正。将拼接矫正过的 DNA 序列在 NCBI 上进行 BLAST 相似性搜索，结合下载的 8 属 17 种蓟马的相应序列分析（表 2）。采用 MEGA 4.0 软件分析序列的碱基组成、变异位点和转换/颠换值（*R*）。

表 1　样品来源及 GenBank 登录号

Table 1　Sample source and GenBank accession no.

属 Family	种类 Species	采集地 Sampling locality	采集时间 Sampling time	寄主植物 Host plant	测序个数 Number of sequenced individuals	登录号 GenBank accession no.
花蓟马属 *Frankliniella*	花蓟马 *F. intonsa* Trybom	云南省华坪县 Huaping, Yunnan	2008.7	油菜 *Brassica campestris*	12	JF719592
	西花蓟马 *F. occidentalis* Pergande	云南省昆明市 Kunming, Yunnan	2009.4	三叶草 *Trifolium repens*	15	JF719597
蓟马属 *Thrips*	八节黄蓟马 *T. flavidulus* Bagnall	广西省来宾市 Laibin, Guangxi	2009.4	川滇金丝桃 *Hypericum forrestii*	15	JF719582
	黄胸蓟马 *T. hawaiiensis* Morgan	云南省泸水县 Lushui, Yunnan	2009.5	油菜 *Brassica campestris*	14	JF719602
	烟蓟马 *T. tabaci* lindeman	云南省临沧市 Lincang, Yunnan	2010.6	韭菜 *Allium tuberosum*	15	JF719579
	蒲公英蓟马 *T. trehernei* Priesner	云南省大理市 Dali, Yunnan	2010.5	蒲公英 *Taraxacum officnala*	6	JF719607
	T. alatus Bhatti	云南省鹤庆县 Heqing, Yunnan	2010.5	九里香 *Murraya paniculata*	12	JF719580
硬蓟马属 *Scirtothrips*	茶黄硬蓟 *S. dorsalis* Hood	云南省华坪县 Huaping, Yunnan	2010.4	芒果 *Mangifera indica*	15	JF719590
大蓟马属 *Megalurothrips*	端大蓟马 *M. distalis* Karny	云南省昆明市 Kunming, Yunnan	2010.5	三叶草 *Trifolium repens*	15	JF719591
棍蓟马属 *Dendrothrips*	茶棍蓟马 *D. minowai* Priesner	云南省普洱市 Puer, Yunnan	2010.6	茶树 *Camellia sinensis*	8	JF719589
三鬃蓟马属 *Lefroyothrips*	褐三鬃蓟马 *L. lefroyi* Bagnall	云南省楚雄市 Chuxiong, Yunnan	2009.6	蔷薇 *Rosa multiflora*	6	JF719600

1.5 系统发育分析

采用 DAMBE 4.5.18 软件（Xia and Xie, 2001）对核苷酸替代饱和性进行分析。采用 MEGA 4.0 软件构建 mtDNA-CO Ⅰ基因序列的 NJ 树，基于 Kimura-2-Parameter 模型，进化树检验运用 Bootstrap 1 000 次重复。用 Phyml 3.0 软件（Guindon and Gascuel, 2003）构建 ML 树，1 000 次重复。用 Mrbayes 3.1.2 软件（Huelsenbeck *et al.*, 2001）构建 Bayesian 树，运行 4 个马尔科夫链，共运行 2 000 000 代，每 100 代储存一次树，舍弃老树样本（250 代）构建一致树。

2 结果与分析

2.1 mtDNA-CO Ⅰ的组成和变异

对蓟马科 9 属 27 种蓟马的 mtDNA-CO Ⅰ基因分析，最终界定 432 bp 的序列长度用于系统发育分析。序列中有 207 个保守位点，222 个变异位点，3 个缺失位点。变异位点包括 29 个单一变异位点、193 个简约信息位点。所有序列 T、C、A、G 含量分别为：37.4%、18.2%、30.9%

表 2 GenBank 中的序列数据

Table 2 Sequences data in GenBank

属 Family	种类 Species	地区 Region	登录号 GenBank accession no.
花蓟马属 *Frankliniella*	*F. cephalica* Crawford	日本 Japan	AB277219
	禾蓟马 *F. tenuicornis* Uzel	中国 China	EF213761
	F. fusca Hinds	美国 USA	AB277218
	梳缺花蓟马 *F. schultzei* Trybom	南非 South Africa	FN545979
	F. bispinosa Morgan	美国 USA	AB277216
蓟马属 *Thrips*	黄蓟马 *T. flavus* Schrank	英国 United Kingdom	AM932039
	棕榈蓟马 *T. palmi* Karny	日本 Japan	FN546133
	色蓟马 *T. coloratus* Schmutz	日本 Japan	AB277221
硬蓟马属 *Scirtothrips*	*S. citri* Moulton	美国 USA	EU101005
	S. bounties Mound	墨西哥 Mexico	EU101006
	S. frondis Hoddle	澳大利亚 Australia	EU101003
	S. inermis Priesner	澳大利亚 Australia	EU101002
裂绢蓟马属 *Hydatothrips*	*H. adolfifriderici* Karny	南非 South Africa	FN546010
绢蓟马属 *Sericothrips*	*S. staphylinus* Haliday	英国 United Kingdom	FN546050
棍蓟马属 *Dendrothrips*	*D. degeeri* Uzel	英国 United Kingdom	FN545968

* 资助项目：农业部公益性行业科研专项项目（201103026, 200803025）；云南省教育厅科学研究基金重点项目（2013Z148）；红河学院植物保护硕士点建设项目；红河学院云南省高校农作物优质高效栽培与安全控制重点实验室项目

**E-mail: ynshdr@126.com

***通讯作者，E-mail: hongruizh@126.com

收稿日期：2013-07-08，接受日期：2013-10-12

纹蓟马属 *Aeolothrips*	白腰纹蓟马 *A.albicinctus* Haliday	英国 United Kingdom	FN545942
阳针蓟马属 *Heliothrips*	温室蓟马 *H. haemorrhoidalis* Bouche	瑞士 Switzerland	AF378683

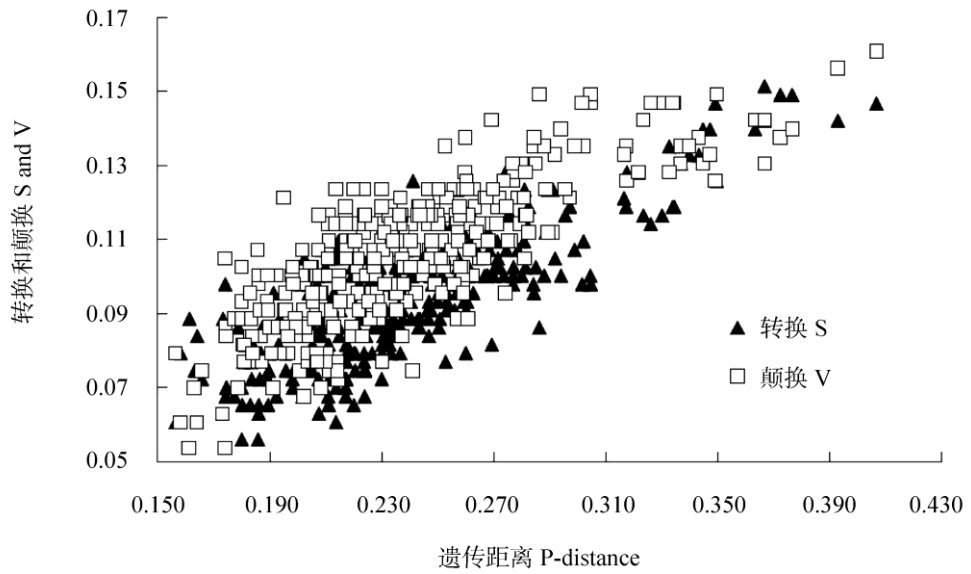

图 1　蓟马科 CO Ⅰ片段的替代饱和度分析

Fig. 1　Substitution saturation analysis of Thripidae based on CO Ⅰ segment

和 13.6%，A+T 含量（68.3%）明显高于 G+C 含量（31.4%），碱基组成表现出明显的偏倚性，序列的转换与颠换比值（*R*）为 0.741。其中，密码子第 1 位、第 2 位、第 3 位点的 *R* 值分别为 0.945、0.871 和 2.276，转换的发生以 T→C，C→T 为主（占 67.93%），蓟马种间的序列分歧度变化在 15.6~40.0 之间。

2.2　系统发育信号检测

蓟马科 CO Ⅰ序列的替代饱和度分析见图 1。当遗传距离小于 0.190 时，转换高于颠换，大于 0.190 时，颠换高于转换。总体上，转换和颠换与遗传距离之间有较好的线性关系，转换和颠换值仍有明显的上升趋势，说明 mtDNA-CO Ⅰ基因的转换和颠换没有达到饱和。因此将所有的转换和颠换位点应用于系统关系的构建。

2.3　系统发育关系

基于 mtDNA-CO Ⅰ构建蓟马科 9 属 27 种蓟马的 NJ 树、ML 树和 Bayes 树。由于构建的 NJ 树支持率较低，因此以 ML 树（图 2）和 Bayesian 树（图 3）进行说明。

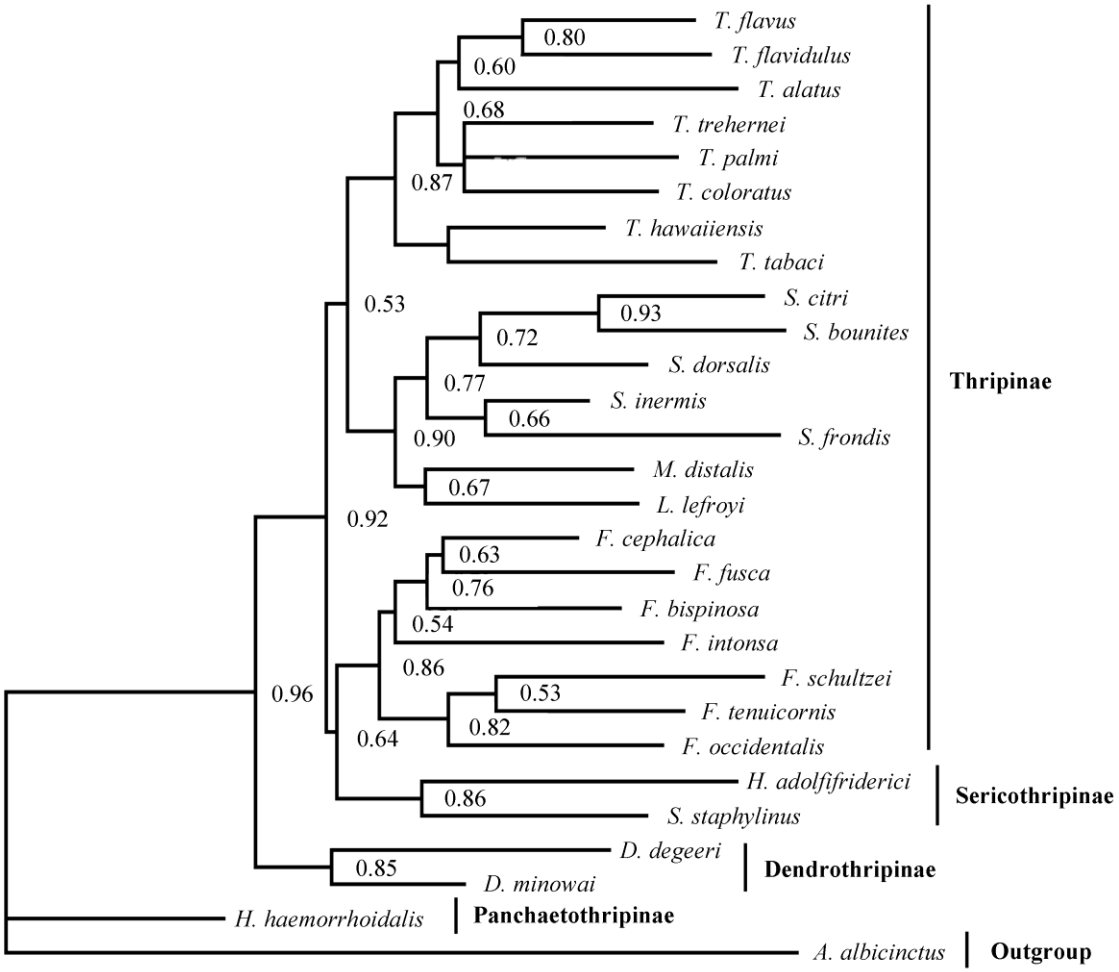

图 2　基于 CO Ⅰ基因片段构建的蓟马科 ML 树

Fig. 2　ML tree of Thripidae based on CO Ⅰ gene segment

注：图中对应的中文名称见表 2。下图同。

The Chinese name in the figure is the same with Table 2. The same below.

* 资助项目：农业部公益性行业科研专项项目（201103026, 200803025）；云南省教育厅科学研究基金重点项目（2013Z148）；红河学院植物保护硕士点建设项目；红河学院云南省高校农作物优质高效栽培与安全控制重点实验室项目

**E-mail: ynshdr@126.com

***通讯作者，E-mail: hongruizh@126.com

收稿日期：2013-07-08，接受日期：2013-10-12

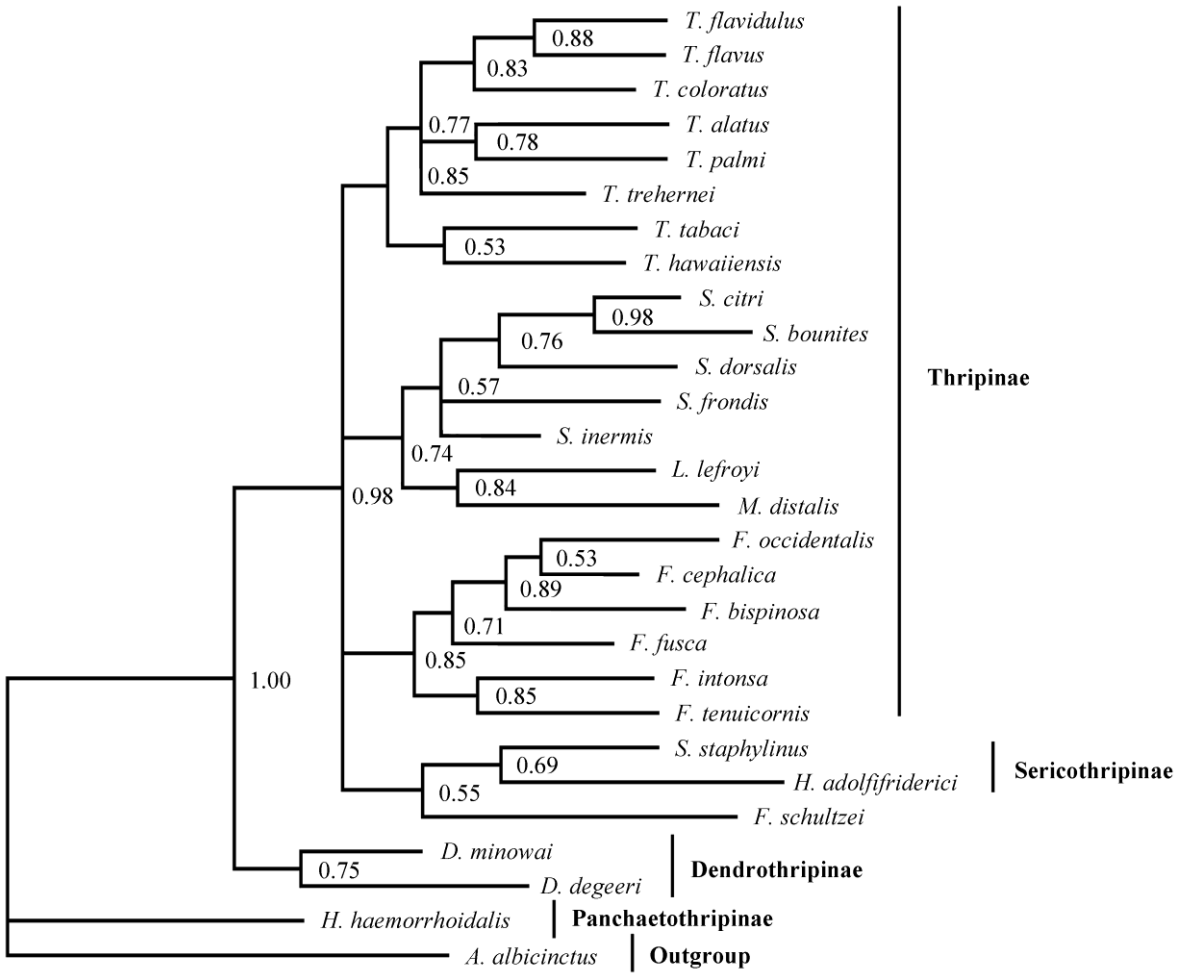

图 3　基于 CO Ⅰ基因片段构建的蓟马科 Bayesian 树
Fig. 3　Bayesian tree of Thripidae based on CO Ⅰ gene segment

ML 树显示针蓟马亚科（Panchaetothripinae）单独形成一个分支，棍蓟马亚科（Dendrothripinae）、绢蓟马亚科（Sericothripinae）和蓟马亚科（Thripinae）聚合为另一个分支（置信度为 96%）。蓟马科的 4 个亚科都能恢复为单系，其中针蓟马亚科从系统树基部最先分出，是蓟马科最为原始的类群。随后棍蓟马亚科从系统树中分出，与绢蓟马亚科和蓟马亚科形成姐妹群。绢蓟马亚科、蓟马亚科的花蓟马属（*Frankliniella*）聚合为一支（置信度为 64%），显示了绢蓟马亚科和蓟马亚科有较近的亲缘关系。蓟马亚科内部分为 3 个分支，第 1 分支为蓟马属（*Thrips*），第 2 分支为硬蓟马属（*Scirtothrips*）、大蓟马属（*Megalurothrips*）和三鬃蓟马属（*Lefroyothrips*）（置信度为 90%），第 3 分支为花蓟马属（*Frankliniella*）。

Bayesian 树显示的拓扑结构与 ML 树基本一致，针蓟马亚科和棍蓟马亚科均能从系统树中明显区分开，绢蓟马亚科与蓟马亚科的花蓟马属混在一起，蓟马亚科也明显分为三支（置信度均在 75%以上）。

3 讨 论

本研究表明蓟马科 9 属 27 种蓟马的碱基组成表现出明显的偏倚性。所有序列的转换与颠换比值（*R*）为 0.741，即颠换比转换高，推测有以下原因：（1）由于某些位点已出现多次替代，系统发育信号检测的散点图也显示转换已接近饱和。（2）mtDNA-CO Ⅰ基因序列碱基组成表现出明显的偏倚性，A+T 含量高增加了 A 与 T 发生颠换的可能性。

基于蓟马科 mtDNA-CO Ⅰ基因构建的系统进化树表明蓟马科的 4 个亚科都能恢复为单系，基本支持 Mound 和 Mossis（2007）的分类系统。研究结果显示针蓟马亚科是蓟马科最为原始的类群，进化树也支持针蓟马亚科为一个单系群（Mound and Mossis, 2007），同时支持 Bhatti（2006）将针蓟马亚科提升为针蓟马科的观点。棍蓟马亚科与绢蓟马亚科、蓟马亚科形成姐妹群，支持棍蓟马亚科的分类阶元。值得注意的是，绢蓟马亚科和蓟马亚科有较近的亲缘关系，支持将绢蓟马亚科降级归入蓟马亚科（韩运发，1997）。蓟马亚科的蓟马属和花蓟马属虽为一个亚科，但两者的第 VI 和 VIII 腹节背板的毛序有明显区别（Mound, 2002）。进化树支持蓟马亚科内部分为三个大的类群，这与 Mound（2002）的观点基本一致。由于蓟马科种类繁多，目前绝大多数种类还未建立基因库，因此需要增加相应分类阶元的种类，增强分类单位的代表性；通过延长扩增 mtDNA-CO Ⅰ基因的序列和联合其他基因进行分析，才能更准确地解释蓟马科的系统发育关系。

参考文献 (References)

Bhatti JS, 2006. The classification of Terebrantia (Insecta) into families. *Oriental Insects*, 40(1): 339–375.

Brunner PC, Fleming C, Frey JE, 2002. A molecular identification key for economically important thrips species (Thysanoptera: Thripidae) using direct sequencing and a PCR-RFLP-based approach. *Agriculture Forest Entomol.*, 4(2): 127–136.

Crespi BJ, Carmean D, Vawter L, Dohlen CV, 1996. The molecular systematics of Thysanoptera. *Systematic Entomology*, 21(2): 79–87.

Guindon S, Gascuel O, 2003. PhyML: A simple, fast, and accu-rate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52(5): 696–704.

Huelsenbeck JP, Ronquist F, Nielsen R, 2001. Bayesian inferenceof phylogenyandits impact onevolutionary biology. *Science*, 294: 2310–2314.

Karimi J, Hassani-Kakhki M, Awal MM, 2010. Identifying thrips (Insecta: Thysanoptera) using DNA Barcodes. *Journal of Cell and Molecular Research*, 2(1): 35–41.

Morris DC, Mound LA, 2003. Thysanoptera phylogeny the molecular future. *Entomologische Abhandlungen*, 61(2): 153–155.

Mound LA, 2002. The *Thrips* and *Frankliniella* genus-groups: the phylogenetic significance of ctenidia. Thrips and Tospoviruses: Proceedings of the 7th International Symposium on Thysanoptera. Reggio Calabria, Italy: 3–6.

Mound LA, Morris DC, 2007. The insect order Thysanoptera: classification versus systematics. *Zootaxa*, 1668: 395–411.

Rugman-Jones PF, Hoddle MS, Stouthamer R, 2010. Nuclear-Mitochondrial barcoding exposes the global pest western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae) as two sympatric cryptic species in its native California. *Molecular Entomology*, 103(3): 877–886.

Toda S, Murai T, 2007. Phylogenetic analysis based on mitochondrial COI gene sequences in Thrips tabaci Lindeman (Thysanoptera: Thripidae) in relation to reproductive forms and geographic distribution. *Appl. Entomol. Zool.*, 42(2): 309–316.

Xia X, Xie Z, 2001. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity*, 92(4): 371–373.

韩运发, 1997. 中国经济昆虫志. 第 55 卷, 缨翅目. 北京: 科学出版社, 123–326. [HAN YF, 1997. Economic Insect Fauna of China. 55 volume, Thysanoptera. Beijing: *Science Press*, 123–326.]

乔玮娜, 万方浩, 张爱兵, 闵亮, 张桂芬, 2012. DNA 条形码技术

在田间常见蓟马种类识别中的应用. 昆虫学报, 55(3): 344–356. [QIAO WN, WANG FH, ZHANG AB, MIN L, ZHANG GF, 2012. Application of DNA barcoding technology for species identification of common thrips (Insecta: Thysanoptera) in China. *Acta Entomologica Sinica*, 55(3): 344–356.]

魏书军, 马吉德, 石宝才, 宫亚军, 刘静, 康总江, 陈学新, 路虹, 2010. 我国新入侵外来害虫美洲棘蓟马的外部形态和分子鉴定. 昆虫学报, 53(6): 715–720. [WEI SJ, MAJID MB, SHI BC, GONG YJ, LIU J, KANG ZJ, CHEN XJ, LU H, 2010. External morphology and molecular identification of the newly found invasive pest *Echinothrips americanus* Morgan (Thysanoptera: Thripidae) in China. *Acta Entomologica Sinica*, 53(6): 715–720.]

游中华, 路虹, 张宪省, 冯纪年, 石宝才, 宫亚军, 黄大卫, 2007. 入侵害虫西花蓟马及其他 8 种常见蓟马的分子鉴定. 昆虫学报, 50(7): 720–726. [YOU ZH, LU HONG, ZHANG XS, FENG JN, SHI BC, GONG YJ, HUANG DW, 2007. Molecular identification of the introduced western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) and other eight common thrips species (Thysanoptera: Thripidae). *Acta Entomologica Sinica*, 50(7): 720–726.]

张利娟, 沈登荣, 张宏瑞, 张宏伟, 李正跃, 2011. 蓟马基因组 DNA 提取方法的改进. 应用昆虫学报, 48(3): 775–781. [ZHANG LJ, SHEN DR, ZHANG HR, ZHANG HW, LI ZY, 2011. Method improvement for extraction genomic DNA from thrips. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(3): 775–781.]