

基于 Cyt b 基因全序列分析河南 7 种菊头蝠系统发育关系

王艳梅^a, 胡凤霞^b, 赵晓进^b

(河南师范大学 a. 生命科学学院; b. 水产学院, 河南 新乡 453007)

摘 要:采用分子系统发育分析方法对菊头蝠科蝙蝠的系统发育关系和分类地位进行研究,以 7 种 127 个蝙蝠为研究对象,测定了 mtDNA Cytb 基因全序列(1140 kb),用最大简约法(maximum parsimony, MP)和最大似然法(maximum likelihood, ML)建系统发育树,对菊头蝠种间亲缘关系及分类地位进行分析,角菊头蝠、菲菊头蝠和大耳菊头蝠属于较原始的种类,且彼此间有较近的亲缘关系;大菊头蝠、皮氏菊头蝠关系较近,为较原始的类群;马铁和中菊头蝠关系较近,为后分化的类群。

关键词:菊头蝠; Cyt b 基因全序列; 系统发育

中图分类号: Q953

文献标志码: A

菊头蝠属(*Rhinolophus*)为菊头蝠科(*Rhinolophoidea*)仅有的一个属,共有 77 种^[1],主要生活于热带和亚热带地区^[2],中国分布 28 种^[3-7],河南分布有 7 种^[8]. 菊头蝠属的系统发育关系虽然已有一些研究,但结果并不完全一致. 有时形态学数据不能完全解决种间的系统发育关系^[9],需要借助于更多分子生物学的方法来了解种间的亲缘关系及系统进化^[10]. 线粒体 Cyt b 基因经常被用作种间或属间系统进化或分类的依据,近年来,利用 Cyt b 基因序列分析的方法,帮助解决了许多在形态学分类中存在争议的问题,已成为现代分类学中的一种常规方法,该方法在不少翼手类的系统发育研究中得到了广泛应用^[11-14]. 本文通过对河南分布的 7 种菊头蝠 Cyt b 基因全序列的测定和分析,探讨各种间的系统发育关系,从而确定其分类地位.

1 材料和方法

1.1 实验材料

2006—2011 年,采用无损伤的方法采集了 127 号菊头蝠科蝙蝠个体. 物种的标本编号、采集地及 GenBank 注册号均列于标本信息见表 1.

1.2 分子系统发育分析

蝙蝠样本 DNA 提取主要参考卢圣栋^[15]的苯酚/氯仿法,4 ℃ 下保存备用. PCR 产物经 10 mg/mL (1.0%) 琼脂糖凝胶电泳检测后送上海生工生物工程有限公司测序. 测回序列经 NCBI 比对,经 Clustal-x^[16]进行序列自动对准,用 MEGA5.0^[17]进行基因序列分析,用 PAUP4.0b10^[18]软件构建 MP^[19-20]和 Neighbor-Joining^[21]法构建系统发育树.

2 结 果

采用 MEGA5.0 计算 9 种菊头蝠(不包括外群)之间的遗传距离(表 2),最小和最大遗传距离分别为

收稿日期:2015-10-22

基金项目:国家自然科学基金(31172056);河南省基础与前沿技术研究计划项目(132300410136);河南省教育厅科学技术研究重点项目(14A180001).

第 1 作者简介:王艳梅(1977—),女,河南鹿邑人,河南师范大学讲师,在读博士研究生,研究方向为动物区系分类及生态,
E-mail:041140@htu.edu.cn

通信作者:赵晓进,河南师范大学教授,E-mail:zxj_6119@163.com.

0.002 和 0.137, 平均距离为 0.121. 其中菲菊头蝠和角菊头蝠间的序列百分比差异只有 0.080, 是 6 种菊头蝠科蝙蝠中遗传距离最小的; 而中菊头蝠和大菊头蝠遗传距离最大为 0.137.

表 1 标本采集信息表

种类	N	采集地	序列号
马铁菊头蝠	69	桐柏朱庄、林州五龙洞、嵩县蝉堂、新县济湾、商城乌龙洞、罗山青山镇、济源潞河、济源黄楝树、辉县要街	544403, 544404
<i>R. ferrumequinum</i>			544405
大耳菊头蝠	4	栾川谷家庄、内乡天心洞、内乡黄龙洞、栾川桃园	555788
<i>R. hinolophus maticus</i>	25	辉县要街、济源黄楝树、商城乌龙洞、桐柏回龙、新县济湾、新县田铺	544417
角菊头蝠			
<i>R. cornutus</i>	2	桐柏桃花洞、新县沙窝镇	544422
大菊头蝠	23	栾川桃园、嵩县白云山、西峡军马河、西峡云华	544421, 544418
<i>R. luctus</i>			544419, 544420
中菊头蝠	4	西峡军马河	544423, 544424
<i>R. affinis</i>	3	西峡	544425
皮氏菊头蝠			
<i>R. pearsoni</i>	5	西峡	544426, 544427
菲菊头蝠			
<i>R. pusillus</i>			
普氏蹄蝠			
<i>H. pratti</i>			

表 2 菊头蝠科蝙蝠成对比较的百分序列差异

种	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	—	0.002	0.003	0.009	0.009	0.012	0.011	0.011	0.012	0.014
2	0.006	—	0.004	0.009	0.009	0.012	0.011	0.011	0.012	0.013
3	0.013	0.016	—	0.009	0.009	0.012	0.011	0.011	0.012	0.014
4	0.079	0.080	0.076	—	0.005	0.011	0.011	0.011	0.011	0.014
5	0.083	0.084	0.080	0.028	—	0.011	0.011	0.011	0.011	0.014
6	0.129	0.133	0.129	0.115	0.117	—	0.011	0.011	0.012	0.015
7	0.118	0.120	0.121	0.114	0.119	0.117	—	0.012	0.012	0.015
8	0.116	0.117	0.123	0.114	0.116	0.119	0.124	—	0.012	0.015
9	0.135	0.132	0.135	0.119	0.120	0.127	0.137	0.131	—	0.015
10	0.174	0.170	0.178	0.184	0.186	0.192	0.198	0.199	0.201	—

注: 总体平均值为 0.121. 1=*R. blythi*, 2=*R. pusillus*, 3=*R. monoceros*, 4=*R. cornutus*, 5=*R. macrotis*, 6=*R. ferr*, 7=*R. affinis*, 8=*R. pear*, 9=*R. luctus*, 10=*H. pratti*.

基于细胞色素 b 全序列, 以普氏蹄蝠(*Hipposiderinae pratti*) 为外类群, 建立菊头蝠科 9 种蝙蝠的 NJ 和 MP 系统发育树, 得到一致的聚类结果(图 1). 系统树分为两大分支: 一支是角菊头蝠 *R. cornutus*、菲菊头蝠 *R. pusillus*、大耳菊头蝠、*R. monoceros* 和 *R. blythi* (后两个为 *genebank* 上下载的序列); 另一支为马铁菊头蝠 *Rhinolophus ferrumequinum*、大菊头蝠 *Rhinolophus luctus*、皮氏菊头蝠 *Rhinolophus pearsoni* 和中菊头蝠 *Rhinolophus affinis*. 马铁菊头蝠首先与中菊头蝠聚在一起再与大菊头蝠、皮氏菊头蝠形成一个分支, 最后与比较原始的角菊头蝠和菲菊头蝠聚在一起.

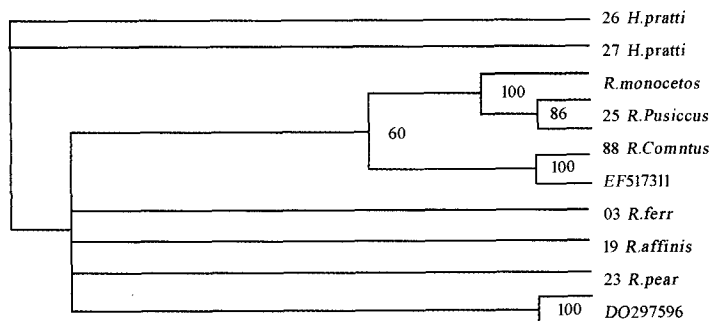


图1 基于Cyt b 基因构建的系统发育树

3 讨 论

本文基于细胞色素 b 全序列,建立 NJ 和 MP 系统发育树,分析了 7 种菊头蝠的系统发育关系。角菊头蝠、菲菊头蝠属于较原始的种类,彼此有较近的亲缘关系可能是同一个种。这与 Keping Sun、Sakai、Stoffberg 的结果一致^[9-12];与 Bogdanowicz^[22]、Bogdanowicz^[23]和 Jones^[9]基于形态学特征分类的结果也一致。在以前的研究中,基于形态学特征的分类认为大耳菊头蝠与体型较大的菊头蝠关系较近;而基于分子的研究则认为,它属于较原始的种类,与体型较小的角菊头蝠、菲菊头蝠等亲缘关系较近,在本研究中也得到了验证。关于体型较大的中菊头蝠、大菊头蝠、皮氏菊头蝠、马铁菊头蝠间的关系一直没有统一的定论,采用不同的研究方法、不同的遗传序列得到的结果都不相同。Keping Sun^[12]分别基于线粒体控制区和线粒体 Cyt b 基因全序列,对部分种类菊头蝠的系统发育关系做了研究,两者关于中菊头蝠和马铁菊头蝠的分类地位结果不同,与 Stoffberg^[10]基于线粒体 Cyt b 基因全序列分析的结果也不同,Stoffberg 认为中菊头蝠、马铁菊头蝠属较原始的种类,皮氏菊头蝠与其他菊头蝠亲缘关系较远,Keping^[12]认为皮氏菊头蝠属较原始的种类,大菊头蝠与其他各菊头蝠的关系较远。本研究中大菊头蝠、皮氏菊头蝠关系较近,为较原始的类群;马铁和中菊头蝠关系较近,为后分化的类群,与袁小爱等研究结果一致^[24]。这种差异可能是由于标本采集地间的地理差异,再者本研究用 Cyt b 基因全序列进行聚类分析,尚需选择更多的基因序列对蝙蝠之间的关系进行深入研究。

总之,本研究从分子水平对菊头蝠科蝙蝠分类地位及系统发育进行研究,结果显示体型较小的蝙蝠关系密切,属比较原始的类群,体型较大的,有较近的亲缘关系。在进一步的研究中,我们将采集更多的标本,选择更多的分子序列标记,来探讨菊头蝠科蝙蝠种间的亲缘关系及系统进化,为更好地保护这一生物类群提供基础资料。

参 考 文 献

- [1] Simmons N B. Order chiroptera. In: Wilson DE, Reeder DM (eds) Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference [M]. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 2005.
- [2] Csorba G, Ujhelyi P, Thomas N. Horseshoe Bats of the World: (Chiroptera: Rhinolophidae)[M]. Shropshire: Alana Books, 2003.
- [3] 王应祥. 中国哺乳动物种和亚种分类名录与分布大全[M]. 北京:中国林业出版社, 2003.
- [4] 吴毅, 杨奇森, 夏霖, 等. 中国蝙蝠新记录——马氏菊头蝠[J]. 动物学杂志, 2004, 39(5): 109-110.
- [5] 张劲硕, 张礼标, 赵辉华, 等. 中国翼手类新记录——小褐菊头蝠[J]. 动物学杂志, 2005, 40(2): 96-98.
- [6] Sun K P, Feng J, Jiang T L, et al. A new cryptic species of *Rhinolophus macrotis* (Chiroptera: Rhinolophidae) from Jiangxi Province, China[J]. Acta Chiropterologica, 2008, 10(1): 1-10.
- [7] Wu, Yi, Vu Dinh Thong. A New Species of *Rhinolophus* (Chiroptera: Rhinolophidae) from China[J]. ZOOLOGICAL SCIENCE, 2011, 28(3): 235-241.
- [8] 张学成. 河南省菊头蝠科蝙蝠分子系统学研究[D]. 新乡:河南师范大学, 2008.
- [9] Jones K E, Purvis A, Maclarnon A N N, et al. A phylogenetic supertree of the bats (Mammalia: Chiroptera)[J]. Biological Reviews, 2002, 77(2): 223-259.
- [10] Stoffberg S, Jacobs D S, Mackie I J, et al. Molecular phylogenetics and historical biogeography of *Rhinolophus* bats[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2010, 54(1): 1-9.
- [11] Sakai T, Kikkawa Y, Tsuchiya K, et al. Molecular phylogeny of Japanese Rhinolophidae based on variations in the complete sequence of the mitochondrial cytochrome b gene[J]. Genes & genetic systems, 2003, 78(2): 179-189.
- [12] KePing S, Jiang F, LongRu J, et al. Structure, DNA sequence variation and phylogenetic implications of the mitochondrial control region in horseshoe bats[J]. Mammalian Biology, 2009, 74(2): 130-144.
- [13] Sun K, Feng J, Zhang Z, et al. Cryptic diversity in Chinese rhinolophids and hipposiderids (Chiroptera: Rhinolophidae and Hipposideridae)[J]. mammalia, 2009, 73(2): 135-141.
- [14] Stadelmann B, Lin L K, Kunz T H, et al. Molecular phylogeny of New World *Myotis* (Chiroptera, Vespertilionidae) inferred from mitochondrial and nuclear DNA genes[J]. Molecular phylogenetics and evolution, 2007, 43(1): 32-48.
- [15] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京:中国协和医科大学出版, 1999.
- [16] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [17] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J].

- Briefings in bioinformatics, 2004, 5(2): 150-163.
- [18] Swofford D L. Phylogenetic Analysis Using Parsimony. Version 4.0b10 for Macintosh[CP]. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 2002.
- [19] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap[J]. *Evolution*, 1985, 39: 783-791.
- [20] Posada D, Buckley T R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests[J]. *Systematic Biology*, 2004, 53(5): 793-808.
- [21] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406-425.
- [22] Bogdanowicz W. Phenetic relationships among bats of the family Rhinolophidae[J]. *Acta Theriologica*, 1992, 37: 213-240.
- [23] Bogdanowicz W, Owen R D. Phylogenetic analyses of the bat family Rhinolophidae[J]. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 1992, 30(2): 142-160.
- [24] 袁小爱, 田东, 谷晓明, 等. 基于核基因 RAG2 部分序列探索菊头蝠总科、蝙蝠科和鞘尾蝠科物种的系统发育关系[J]. *生命科学研究*, 2012, 16(3): 215-222.

Taxonomic and Phylogenetic Status of Rhinolophus Bats Based on Cyt b Gene Sequence

WANG Yanmei^a, HU Fengxia^b, ZHAO Xiaojin^b

(a. College of life science; b. College of Fisheries, Henan Normal University, Xingxiang 453007, China)

Abstract: Rhinolophus bats include one genera and 77 species, and are mainly distributed in both temperate and tropical areas. Based on molecular data, we studied the taxonomic status of Rhinolophus bats. The 1140 kb DNA sequences of mt DNA Cyt b gene from 89 individuals of seven Rhinolophus bats species were obtained. Both of the MP and ML phylogenetic trees showed that the seven Rhinolophus bats species are clustered into two clades, among which the smaller Rhinolophus cornutus is closely clustered with Rhinolophus macrotis firstly; the bigger Rhinolophus affinis and Rhinolophus ferrumequinum, Rhinolophus pearsonii, Rhinolophus luctus are clustered as a clade. In molecular trees, Rhinolophus cornutus, Rhinolophus macrotis and Rhinolophus pusillus, Rhinolophus ferrumequinum, Rhinolophus pearsonii, Rhinolophus affinis and Rhinolophus luctus are clustered as two groups I and II respectively. The group I and II have relatively close relationship, and with very high bootstrap value. All phylogenetic trees have produced the monophyletic clade of Rhinolophidae. It is necessary to collect more species and use more molecular data to resolve the phylogeny of Rhinolophus bats.

Keywords: Rhinolophus bats; Cyt b gene sequence; phylogeny