

从核 rDNA 序列探讨隙蛛亚科 *Coelotinae* 的分类地位*

毕可然 周开亚** 宋大祥

南京师范大学生命科学学院江苏省生物资源技术重点实验室, 南京 210097

Phylogenetic position of the spider subfamily *Coelotinae* (Araneae) inferred from nuclear rDNA gene sequences*

BI Ke-Ran, ZHOU Kai-Ya^{1**}, SONG Da-Xiang

Jiangsu Key Laboratory for Bioresource Technology, College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China

Abstract The phylogenetic position of the subfamily *Coelotinae*, which belongs to *Amaurobiidae* currently but *Agelenidae* formerly, has remained controversial. The sequences of 28S and 18S rDNA fragments were obtained from six species of spiders representing *Ageleninae*, *Amaurobiinae*, *Coelotinae* and *Clubionidae*. Neighbor-joining (NJ), maximum parsimony (MP), maximum-likelihood (ML) and Bayesian (BI) analyses generated identical tree topologies. All trees from the 28S rDNA data derived from neighbor-joining, maximum parsimony, maximum-likelihood and Bayesian analyses support the *Coelotinae* as the sister group of the *Ageleninae*, and strongly support the *Coelotinae* + *Ageleninae* are the sister group of the *Amaurobiinae*. The topology in the trees inferred from 18S data is similar to those of 28S rDNA but with lower bootstrap support. The results indicate that *Coelotinae* is probably a subfamily of the family *Agelenidae*. In addition, the close relationship between *Asiacoelotes* and *Draconarius* of the subfamily *Coelotinae*, *Agelena* and *Alloagelena* of the subfamily *Ageleninae* is strongly supported by the results of analyses of the 28S rDNA sequences. This indicates that the sequence could be used as a molecular marker in the study of phylogenetic relationships among the genera of spiders [*Acta Zoologica Sinica* 51 (3): 521-525, 2005].

Key words *Coelotinae*, *Ageleninae*, *Amaurobiinae*, 28S rDNA, 18S rDNA, Molecular systematics

关键词 隙蛛亚科 漏斗蛛亚科 暗蛛亚科 28S rDNA 18S rDNA 分子系统学

隙蛛亚科 *Coelotinae* 主要分布于东亚地区, 其中我国的已有种类占到全世界种数的一半以上, 因此对于我国隙蛛类蜘蛛的研究已经成为世界暗蛛科研究的重点之一。隙蛛亚科属于无筛器类群, 于 1893 年, 由 Cambridge 以隙蛛属为模式属而建立, 归属于无筛器的漏斗蛛科。之后, 虽然经历了数次修订: 如 Forster (1970) 和 Forster and Wilton (1973) 均把隙蛛亚科归属于漏斗蛛科。Wunderlich (1986) 在比较了隙蛛亚科与漏斗蛛属 *Agelena* 和暗蛛属 *Amaurobius* 蜘蛛雌雄生殖器的结构后, 认为无筛器的隙蛛亚科在生殖器结构上更接近于有筛器的暗蛛科, 提出将隙蛛亚科从漏斗蛛科转移至有筛器的暗蛛科。随后在 Platnick (2004)

撰写的世界蜘蛛名录中也做了相应的变动。

迄今, 隙蛛亚科的新属、新种时有报道, 但对隙蛛亚科究竟应该隶属于漏斗蛛科抑或暗蛛科仍有争论。在分子系统学方面, 吴琛等 (2002) 在以 12S rDNA 第三结构域序列探讨蜘蛛若干类群亲缘关系时指出: 隙蛛亚科与暗蛛亚科关系近于与漏斗蛛亚科, 重建的最大似然树显示隙蛛亚科与暗蛛亚科聚为一支, 节点的自展值为 68, 并且隙蛛亚科与暗蛛亚科聚类后, 才与漏斗蛛亚科 + 缕网蛛科聚类。此分析结果说明隙蛛亚科隶属于暗蛛科。在形态学方面, 张志升* 等将隙蛛亚科与产于中国的漏斗蛛科 4 属、暗蛛亚科 2 属, 以及分布在北美等地的暗蛛属等类群特征进行比较, 发现隙蛛亚科的种

2004-08-20 收稿, 2005-03-01 接受

* 国家自然科学基金重点项目 (30130040) [The research was funded by the grant from National Science Foundation of China (Key Project No. 30130040)]

** 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: kyzhouj@126.com

动物学报 *Acta Zoologica Sinica*

类在一些形态性状上与漏斗蛛亚科相近, 支持隙蛛亚科归入漏斗蛛科。

28S rDNA 和 18S rDNA 序列的基因编码区可分为高度保守区、保守区、可变区和高可变区, 不同区段适合解决不同阶元的系统发生问题。随着分子系统学的发展, 28S rDNA 与 18S rDNA 序列不仅在节肢动物分子进化研究中得到了广泛的应用 (Hovmöller et al., 2002; Luan et al., 2003; Wheeler et al., 2001), 而且在蜘蛛类的系统发生中也有较多的应用 (Pan et al., 2004; Hausdorf, 1999; Hedin and Maddison, 2001)。我们选取了隙蛛亚科 2 属、漏斗蛛亚科 2 属、暗蛛亚科 1 属、管巢蛛科

1 属与狒蛛科 1 属共 7 种蜘蛛, 利用 28S rDNA 与 18S rDNA 部分序列作为遗传标记, 以期对隙蛛亚科的分类地位提供新的分子证据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用蜘蛛标本来源及 GenBank 检索号见表 1。个体较大的蜘蛛取其足放于 100% 酒精或者 TE 缓冲液内, 然后放于 -80°C 冰箱内保存以备提取基因组 DNA; 个体小的蜘蛛取整个头胸部或者全部来获取基因组 DNA。

表 1 本文研究的材料

Table 1 Material examined in the present study

科(亚科)名 Family (Subfamily)	种名 Species	采集地 Locality	28S rDNA gene	18S rDNA gene	来源 Source
漏斗蛛亚科 Ageleninae	迷宫漏斗蛛 <i>Agelena labyrinthica</i>	河北保定 Baoding, Hebei	AY633851	AY633862	本研究 This study
	机敏异漏斗蛛 <i>Alloagelena difficilis</i>	江苏南京 Nanjing, Jiangsu	AY633850	AY633860	本研究 This study
暗蛛亚科 Amaurobiinae	西藏塔母蛛 <i>Tamgrinia tibetana</i>	西藏南木林县 Namlin, Xizang	AY633849	AY633864	本研究 This study
隙蛛亚科 Coelotinae	普氏亚隙蛛 <i>Asiacoelotes plancyi</i>	河北保定 Baoding, Hebei	AY633853	AY633867	本研究 This study
	褐色龙隙蛛 <i>Draconarius brunneus</i>	西藏亚东县 Yadong, Xizang	AY633855	AY633868	本研究 This study
管巢蛛科 Clubionidae	伪蕾管巢蛛 <i>Clubiona pseudogermanica</i>	河北保定 Baoding, Hebei	AY633858	AY633869	本研究 This study
狒蛛科 Theraphosidae	<i>Aphonopelma hentzi</i>	Obtained from Carolina Biological Supply Company	AY210803	X13457	Mallatt et al., 2004; Hendriks et al., 1988

1.2 总 DNA 的提取、28S rDNA 与 18S rDNA 部分片段的扩增和测序

采用常规方法: SDS/蛋白酶 K 法与酚/氯仿法从蜘蛛足或者其他组织内提取基因组 DNA。rDNA 序列具有高保守性, 为引物设计提供了很大的方便。28S rDNA 扩增引物为: 28S “O”, 5'-GAA ACT GCT CAA AGG TAA ACG G-3'; 28S “C”, 5'-GGT TCG ATT AGT CTT AGT CTT TCG CC-3' (Hedin and Maddison, 2001); 18S rDNA 扩增引物为: 18S-ai, 5'-CCT GAG AAA CGG CTA CCA CAT C-3'; 18S-b0.5, 5'-GTT TCA GCT TTG CAA CCA T-3' (Pan et al., 2004)。PCR 反应总体积为 30 μl ; 模板 DNA, 0.2 mmol/L

dNTP, 2.0 mmol/L MgCl_2 , 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 两条引物各 10 pmol, 1 U *Taq* 酶 (Promega)。聚合酶链式反应 (PCR) 在 PTC-200 型 DNA 扩增仪 (MJ Research) 上进行, 反应参数: 96°C 预变性 5 min, 然后按照下列参数进行 35 个循环: $95^{\circ}\text{C}/40\text{ s}$, $55^{\circ}\text{C}/50\text{ s}$ (28S rDNA) 或者 $50^{\circ}\text{C}/30\text{ s}$ (18S rDNA), $72^{\circ}\text{C}/1\text{ min}$, 循环结束后 72°C 延伸 10 min。所有 PCR 反应都设空白对照, 确保 PCR 反应过程中未发生污染。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 紫外检测。因为 PCR 产物中常常会残留过剩的引物、dNTP、盐离子, 它们的存在严重影响测序反应的进行, 为排除其干扰, 测序前用 2% 琼脂糖凝胶电

* 张志升, 朱明生, 宋大祥, 2003. 中国漏斗蛛科和暗蛛科分类研究. (蛛形纲: 蜘蛛目). 河北大学硕士学位论文, 1-84.

泳, 切胶、用纯化试剂盒 (杭州维特洁) 纯化目的条带。28S rDNA 和 18S rDNA 部分序列采用双向测序法测定, 测序反应用 377 型全自动遗传分析仪 (Applied Biosystem) 完成。

1.3 系统发生分析

获得的序列和从 GenBank 检索的序列用 Clustal X 1.8 软件 (Thompson et al., 1997) 比对, 辅以人工校对。用 Modeltest 3.06 软件 (Posada and Crandall, 1998) 选择重建系统发生树的最适参数, 28S rDNA 的最适参数是: Base = (0.1955 0.2783 0.3398), Nst = 6, Rmat = (1.0000 1.7290 1.0000 1.0000 3.7407), Rates = gamma, Shape = 1.3030, Pinvar = 0。18S rDNA 的最适参数是: Base = equal, Nst = 6, Rmat = (1.0000 5.3162 1.0000 1.0000 1.2653), Rates = gamma, Shape = 0.0066, Pinvar = 0。在 PAUP 4.0b10 软件包 (Swofford, 2002) 中利用以上参数以邻接法 (Neighbor-joining, NJ)、最大简约法 (Maximum parsimony, MP) 和最大似然法 (Maximum-likelihood, ML) 重建分子系统树。贝叶斯法 (Bayesian, BI) 分析用 MrBayes 3.0 软件 (Huelsenbeck et al., 2001) 完成。设置的参数是: Lset nst = 6 Rates = Gamma; mcmc ngen = 20000; mcmc; 构树时都以 *Aphonopelma hentzi* 为外群, 用自引导检验 (Bootstrap test), 1 000 次重复及后验概率 (Posterior probability) 估计系统树中各节点的可靠性。

2 结 果

在 28S rDNA 序列的系统发生分析中, 最大简约法启发式搜索得到一棵严格一致树的 CI 值为 0.8989、RI 值为 0.642。在 Modeltest 3.06 软件 (Posada et al., 1998) 选择的最适参数下启发式搜索得到最大似然树的 -lnL 值为 3181.62950。所得邻接树、最大简约树、最大似然树和贝叶斯树的拓扑结构见图 1。

在 18S rDNA 序列的系统发生分析中, 最大简约法启发式搜索得到一棵严格一致树的 CI 值为 0.9762、RI 值为 0.8750。在 Modeltest 3.06 软件 (Posada et al., 1998) 选择的最适参数下启发式搜索得到最大似然树的 -lnL 值为 1184.72317。四种不同方法建立的邻接树、最大简约树、最大似然树

和贝叶斯树的拓扑结构见图 2。

28S rDNA 序列分析结果强烈支持隙蛛亚科 + 漏斗蛛亚科是暗蛛亚科的姐妹群 (自引导值 100, 后验概率 1.00)。18S rDNA 序列分析结果与 28S rDNA 序列分析结果相似, 都是隙蛛亚科与漏斗蛛亚科聚为一支, 然后, 隙蛛亚科 + 漏斗蛛亚科与暗蛛亚科聚类, 自引导值 (NJ: 57, MP: 80, ML: 54) 和后验概率 (BI: 0.68) 不高。这说明隙蛛亚科与漏斗蛛亚科的关系可能近于与暗蛛亚科的关系。

3 讨 论

据 Shaffer et al. (1997) 提出的系统树中各节点所代表的置信度的标准, 即抽样自引导值大于 90 时为极显著, 70-89 为较显著, 小于 70 时则为显著。除基于 18S rDNA 的最大似然树的自引导值是显著水平外, 28S rDNA 和 18S rDNA 研究都以高的自引导值与后验概率支持无筛器的隙蛛亚科与无筛器的漏斗蛛亚科的近缘关系。就 28S rDNA 而言, 邻接分析的置信度达到了极显著水平 (自引导值 97), 最大简约和最大似然分析都达到了较显著水平 (自引导值依次为 86 和 72), 贝叶斯树节点的后验概率是 0.95; 18S rDNA 的邻接、最大简约分析统计置信度都达到了较显著水平 (自引导值依次为 79、81), 最大似然分析的统计置信度达到了显著水平 (自引导值 68), 贝叶斯树节点的后验概率为 0.98。另外, 对 28S rDNA 序列的分析还对隙蛛亚科亚隙蛛属 *Asiacoelotes* 与龙隙蛛属 *Draconarius* 间, 漏斗蛛亚科漏斗蛛属 *Agelena* 与异漏斗蛛属 *Alloagelena* 间的近缘关系分别给予强烈支持, 邻接、最大简约和最大似然分析的统计置信度都在极显著水平以上 (自引导值 > 90, 有的达 100)。

我们的结果不支持 Wunderlich (1986) 根据形态学性状将隙蛛亚科移至暗蛛科的观点, 也不支持吴琛等 (2002) 基于 300 bp 左右的 12S rRNA 基因第三结构域提出的隙蛛亚科归属于暗蛛科的观点, 而与张志升*等的研究结果相一致。张志升等发现隙蛛亚科的种类与漏斗蛛亚科一样都无筛器与栉器; 后侧纺器 2 节, 细长, 末节长于基节; 雄蛛触肢膝节突 1-2 个或无、胫节突 1-2 个, 雌蛛交媾管宽阔或管状, 纳精囊分头部、颈部和基部, 支持其归入漏斗蛛科。虽然 Wunderlich (1986) 根据雌

* 张志升, 朱明生, 宋大祥, 2003. 中国漏斗蛛科和暗蛛科分类研究. (蛛形纲: 蜘蛛目). 河北大学硕士学位论文. 1-84.

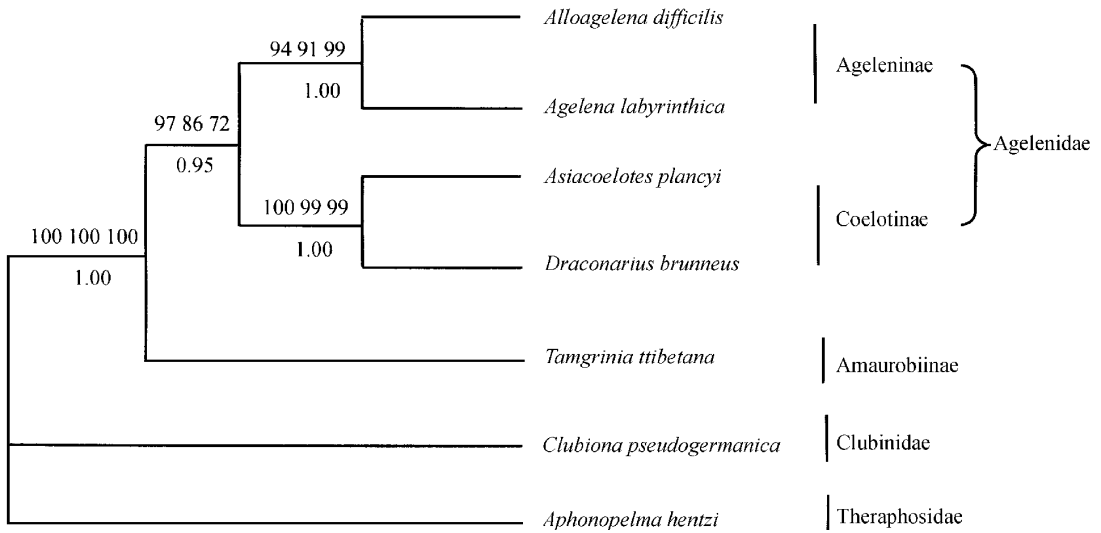


图 1 基于七种蜘蛛 28S rDNA 序列重建的邻接树、最大简约树、最大似然树和贝叶斯树

支上的数字依次代表邻接树、最大简约树和最大似然树（从左到右）1 000 次重复的自引导值，支下的数字代表贝叶斯树的后验概率值。

Fig. 1 Neighbor-joining, maximum parsimony, maximum-likelihood and Bayesian trees based on 28S rDNA sequence data of seven species of spiders

Numbers above the branches refer to the bootstrap values calculated from NJ, MP and ML analyses (from the left to the right) of 1 000 replicates, respectively, and numbers below branches correspond to posterior probabilities estimated using the Bayesian approach.

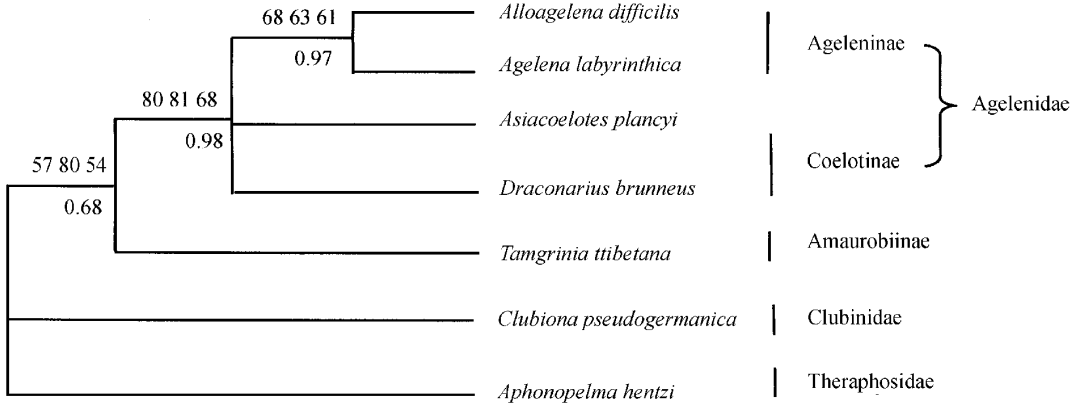


图 2 基于七种蜘蛛 18S rDNA 序列重建的邻接树、最大简约树、最大似然树和贝叶斯树

支上的数字依次代表邻接树、最大简约树和最大似然树（从左到右）1 000 次重复的自引导值，支下的数字代表贝叶斯树的后验概率值。

Fig. 2 Neighbor-joining, maximum parsimony, maximum-likelihood and Bayesian (BI) trees based on 18S rDNA sequence data of seven species of spiders

Numbers above the branches refer to the bootstrap values calculated from NJ, MP and ML analyses (from the left to the right) of 1 000 replicates, respectively, and numbers below branches correspond to posterior probabilities estimated using the Bayesian approach.

雄生殖器的结构比较, 认为隙蛛亚科更接近暗蛛科, 但是他在文章中的描述比较模糊, 不足以支持隙蛛亚科属于暗蛛科。分子系统学方面, Nei and Kumar (2000) 指出: 当所用的序列多而基因或 DNA 片段短时, 核苷酸或氨基酸替代的数目就会受制于大量随机误差的影响, 最大简约法、最小进

化法 (minimum evolution, ME) 和最大似然法中使用过的最小或者最大原理可能会给出错误的拓扑结构。Fang et al. (2000) 也证明 DNA 片段较短时, 诊断上的干扰就很大。吴琛等重建的最大似然树, 尽管隙蛛亚科与暗蛛亚科相聚节点的置信度达到了显著水平 (自引导值为 68), 由于序列来自于 19

头蜘蛛，长度只有 300 bp 左右，这一结论还是不确定的。我们的分析结果认为隙蛛亚科可能归属于漏斗蛛科。

漏斗蛛科的漏斗蛛属 *Agelena* 与异漏斗蛛属 *Alloagelena*，虽然都是 8 眼两列，前眼列后凹，后眼列前凹，后眼列宽于前眼列，雌蛛外雌器交媾管宽阔，纳精囊分为头部、颈部和基部，但也有明显的不同。*Alloagelena* 在纳精囊上无一个叫纳精囊突的小的圆形突起，雄蛛触肢胫节无侧突，纳精囊头外侧位，而 *Agelena* 在纳精囊上有一个叫纳精囊突的小的圆形突起，雄蛛触肢胫节有侧突，纳精囊头内侧位。龙隙蛛属 *Draconarius* 与亚隙蛛属 *Asiacoelotes* 则是隙蛛亚科的两个近缘属，二者形态上相比较，除了 *Draconarius* 雄蛛触肢器有引导器背突、雌蛛外雌器交媾管起源于外雌器后位，*Asiacoelotes* 雄蛛触肢器无引导器背突、雌蛛外雌器交媾管起源于外雌器中部外，其余特征都相似。然而，在传统分类学中，尚未报道过漏斗蛛科和隙蛛亚科属间的亲缘关系。Hedin and Maddison (2001) 曾指出 28S rDNA 序列片段可作为蜘蛛属间分类阶元的分子依据，本文获得的结果也表明此序列可作为研究蜘蛛类属间系统发生关系的分子标记。但要深入探讨漏斗蛛亚科、隙蛛亚科内各属间的系统发生问题，还需增加更多属的蜘蛛标本，选择更多合适的分子标记、并结合形态学、解剖学等特征进行全面的分析。

致 谢 感谢河北大学张志升博士为本论文提供了大量标本；感谢本研究所周长发副教授、张华、张国强在软件使用方面给予的指导；感谢盖永华帮助对文章初稿的修改。

参考文献 (References)

Fang KY, Lue BW, Chen SH, Lue KY, 2000. Phylogenetic corroboration of superfamily Lycosoidae spiders (Araneae) as inferred from partial mitochondrial 12S and 16S ribosomal DNA sequences. *Zoological Studies* 39 (2): 107–113.

Forster RR, 1970. The spiders of New Zealand. Part 3. Desidae, Dictynidae, Hahniidae, Amaurobioiidae, Nicodamidae. *Otago. Mus. Bull.* 3: 1–184.

Forster RR, Wilton CL, 1973. The spiders of New Zealand. Part 4. Agelenidae, Stiphidae, Amphinctidae, Amaurobioiidae, Nelonidae, Ctenidae, Psecridae. *Otago. Mus. Bull.* 4: 1–309.

Hausdorf B, 1999. Molecular phylogeny of araneomorph spiders. *J. Evol. Biol.* 12: 980–985.

Hedin MC, Maddison WP, 2001. A combined molecular approach to phylogeny of the jumping spider subfamily Dendryphantinae (Araneae: Salticidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 18: 386–403.

Hendriks L, Van Broeckhoven C, Vandenbergh A, Van de Peer Y, De Wachter R, 1988. Primary and secondary structure of the 18S ribosomal RNA of the bird spider *Eurypelma californica* and evolutionary relationships among eukaryotic phyla. *Eur. J. Biochem.* 177: 15–20.

Hovmöller R, Pape T, Källersjö M, 2002. The Palaeoptera problem: basal pterygote phylogeny inferred from 18S and 28S rDNA sequences. *Cladistics* 18: 313–323.

Huelsenbeck JP, Ronquist F, Nielsen R, Bollback JP, 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science* 294: 2 214–2 310.

Luan YX, Zhang YP, Yue QY, Pang JP, Xie RD, Yin WY, 2003. Ribosomal DNA gene and phylogenetic relationships of Diplura and lower Hexapods. *Science of China (series C)* 46: 67–76.

Mallatt JM, Garey JR, Shultz JW, 2004. Ecdysozoan phylogeny and Bayesian inference: first use of nearly complete 28S and 18S rRNA gene sequences to classify the arthropods and their kin. *Mol. Phylogenet. Evol.* 31: 178–191.

Nei M, Kumar S, 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York: Oxford University Press. 145–146.

Pan HC, Zhou KY, Song DX, Qiu Y, 2004. Phylogenetic placement of the spider genus *Nephila* (Araneae: Araneoidea) inferred from rRNA and MaSp1 gene sequences. *Zool. Sci.* 21 (3): 343–351.

Platnick NI, 2004. The World Spider Catalog, version 3.5. The World Spider Catalog, version 4.5. American Museum of Natural History, online at <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/INTR01.html>.

Posada D, Crandall KA, 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14 (9): 817–818.

Shaffer HB, Meylan P, Mcknight ML, 1997. Test of turtle phylogeny: molecular, morphological, and paleontological approaches. *Syst. Biol.* 46: 235–268.

Swofford DL, 2002. "PAUP *: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods)," Version 4.0b10. Sunderland, MA. Sinauer.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, 1997. Clustal X windows interface: flexible strategies multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acid. Res.* 24: 4 876–4 882.

Wheeler WC, Whiting M, Wheeler QD, Carpenter JM, 2001. The phylogeny of the extant Hexapod orders. *Cladistics* 17: 113–169.

Wu C, Song DX, Zhu MS, 2002. On the phylogeny of some important groups of spiders by using the third domain of 12S rRNA gene sequence analyses. *Acta Arachnologica Sinica* 11 (2): 65–73 (In Chinese).

Wunderlich J, 1986. *Spinnenfauna Gestern und Heute. I. Fossile Spinnen in Bernstein und Ihre Heute Lebenden Verwandten*. Wiesbaden: Erich Bauer verlag bei Quelle and Meyer.

Zhang ZS, Zhu MS, Song DX, 2003. A preliminary study on the taxonomy of spiders of Agelenidae and Amaurobioiidae from China (Arachnida: Araneae). Masteral Dissertation, Hebei University 1–84 (In Chinese).

吴 琛, 宋大祥, 朱明生, 2002. 从 12S rRNA 基因第三结构域序列分析探讨蜘蛛若干重要类群的亲缘关系. *蛛形学报* 11 (2): 65–73.