

基于线粒体 *COX1* 基因的蚕蛾类系统发育分析

李桃红, 郭 畅, 刘朝良, 王 磊*

(安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036)

摘 要: 基于生物信息学的方法, 以 16 种蚕蛾类昆虫作为研究对象, 利用线粒体基因 *COX1* 的碱基序列作为分子标记对其系统发育信息进行分析。结果表明, *COX1* 基因序列具有明显的 AT 偏倚性, 编码氨基酸的密码子有 26 个具有明显的使用偏好性, 种群间的校正遗传距离在 0.003~0.177 之间, 表明蚕蛾类昆虫的亲缘关系近。利用 MEGA6 软件, 分别采用邻接法 (NJ) 和最大似然法 (ML) 构建系统发育树, 其发育树的分支明显, 大部分的节点支持率都很高, 进一步说明了蚕蛾类昆虫的亲缘关系较近。本研究补充了对蚕蛾类传统分类的认识, 也为蚕蛾类昆虫的分类提供依据。

关键词: 蚕蛾类; *COX1* 基因; 序列分析; 系统发育树

中图分类号: S881.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2019)03-0496-08

Phylogenetic analysis of silkworm moth based on mitochondrial *COX1* gene

LI Taohong, GUO Chang, LIU Chaoliang, WANG Lei

(School of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: Based on bioinformatics, the phylogenetic information of 16 species of silkworm moths was analyzed by using the base sequence of *COX1* as a molecular marker. The results showed that the nucleotide sequence of *COX1* gene has obvious AT bias, and 26 codons in the codons of coding amino acids with obvious usage bias. The corrected genetic distance among populations was within the range of 0.003-0.177, indicating that silkworm moths have close genetic relationships. Using MEGA6 software, the phylogenetic tree was constructed by neighbor-Joining (NJ) and maximum likelihood (ML), respectively. The branches of the development tree were obvious, and most of the node support rates were very high, further indicated that the relationship between silkworm moth insects is closer. This study supplements the knowledge of the traditional classification of silkworm moths and provides a basis for the classification of silkworm moths.

Key words: silkworm moth; *COX1* gene; sequence analysis; phylogenetic tree

蚕蛾类昆虫主要包括蚕蛾科 (Bombycidae) 和大蚕蛾科 (Saturniidae)^[1], 它们均隶属于节肢动物门 (Arthropoda)、昆虫纲 (Insecta)、有翅亚纲 (Pterygota) 和鳞翅目 (Lepidoptera)。鳞翅目是昆虫纲的第二大目, 包括各种蝴蝶和蛾类, 其中绝大部分属于蛾类, 蝶类只约占十分之一。蝴蝶和蛾类均属于完全变态类的昆虫, 在一个世代中, 需历经卵、幼虫、蛹和成虫 4 个发育阶段。蚕蛾科昆虫主要分布在埃塞俄比亚区和东洋区, 是鳞翅目中较小类群, 蚕蛾科包括 5 个属, 其中蚕蛾属 (*Bombyx*)

受到了人们的高度关注, 最常见的有家蚕 (*Bombyx mori*) 和野桑蚕 (*Bombyx mandarina*)^[1]。大蚕蛾科又名天蚕蛾科, 主要分布在热带地区, 其体型普遍较大, 是鳞翅目中种类最多的科, 目前已知有 1 300~1 500 种^[2], 常见的有蓖麻蚕 (*Samia cynthia ricini*)、柞蚕 (*Antheraea pernyi*)、樟蚕 (*Eriogyna pyretorum*)、半目大蚕蛾 (天蚕) (*Antheraea yamamai*) 和琥珀蚕 (*Antheraea assama*) 等。目前蚕蛾类昆虫的分类主要还依赖于形态学特征, 由于部分种类因外部形态差别小, 难以鉴别, 在分类学地位上还存在着争议^[3];

收稿日期: 2018-09-20

基金项目: 安徽省高校优秀青年人才支持计划重点项目 (gxyqZD2018019) 资助。

作者简介: 李桃红, 硕士研究生。E-mail: 1479604148@qq.com

* 通信作者: 王 磊, 博士, 副教授。E-mail: wanglei20041225@163.com

所以蚕蛾类昆虫之间的亲缘关系、系统进化关系也不够明确清晰。

线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 具有分子量小、高拷贝、不发生重组, 相对于核基因来说, 进化速率较快^[4], 一般 mtDNA 平均进化速率是单拷贝核 DNA 的 1~2 倍^[5-6], 是研究属、种间系统发育较好的遗传物质。线粒体细胞色素 C 氧化酶第 I 亚基(*COXI*)基因是 mtDNA, 因其拥有较多的发育信号, 且进化速率适中, 经常被用于种群间的进化分化研究^[7]。*COXI* 曾多次被用于鳞翅目昆虫的系统分析^[8-9], 在蚕蛾类昆虫的系统分析中也有应用^[10-11]。基于线粒体 *COXI* 基因, 本研究分析了蚕蛾类昆虫物种间序列的碱基组成、密码子的偏向性及变异特征, 并且对其进行了系统发育的分析, 重

新构建了系统发育树, 为它们的系统分类学提供了分子水平上的证据, 为更好地理解蚕蛾类昆虫之间的亲缘关系及演化关系奠定了基础, 也为鳞翅目昆虫的相关研究提供了借鉴。同时在经济价值的利用与开发、同类害虫的防治有着指导性的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究中的 18 种鳞翅目昆虫的线粒体 *COXI* 基因序列 (表 1) 均获取于 NCBI 的 GenBank 数据库中, 其中蚕蛾类昆虫的基因序列有 16 条, 以及作为外群的果蝇 (*Drosophila incompta*) 与冈比亚按蚊 (*Anopheles gambiae*) 2 个外群^[9]。

表 1 18 种昆虫的 *COXI* 基因 GenBank 登录号
Table 1 *COXI* gene GenBank accession number of 18 species of insects

科 Family	属 Genera	种 Species	登录号 Accession No.	
蚕蛾科 Bombycidae	家蚕蛾属 <i>Bombyx</i> Linnaeus	家蚕 <i>Bombyx mori</i>	NC_002355	
		家蚕 <i>Bombyx mori</i>	NC_026518	
	野蚕蛾属 <i>Theophila</i> Moore	野桑蚕 <i>Bombyx mandarina</i>	NC_003395	
		桑蟥 <i>Rondotia menciaana</i>	NC_021962	
	赭蚕蛾属 <i>Triuncina</i>	戴氏赭蚕蛾 <i>Triuncina daii</i>	NC_036484	
		大蚕蛾科 Saturniidae	尾蚕蛾属 <i>Actias</i> Leach	绿尾大蚕蛾 <i>Actias selene</i>
	弧目大蚕蛾属 <i>Neoris</i> Moore		弧目大蚕蛾 <i>Neoris haraldi</i>	NC_036765
	目大蚕蛾属 <i>Caligula</i> Moore		合目大蚕蛾 <i>Saturnia boisduvalii</i>	NC_010613
	樟蚕属 <i>Eriogyna</i> Jordan		樟蚕 <i>Eriogyna pyretorum</i>	NC_012727
	巨大蚕蛾属 <i>Attacus</i> Linnacus		乌柏大蚕蛾 <i>Attacus atlas</i>	NC_021770
樗蚕蛾属 <i>Samia</i> Hubner	宽带樗蚕 <i>Samia canningi</i>		NC_024270	
	蓖麻蚕 <i>Samia cynthia ricini</i>		NC_017869	
柞蚕属 <i>Antheraea</i> Hubner	柞蚕 <i>Antheraea pernyi</i>		NC_004622	
果蝇科 Drosophilidae	果蝇属 <i>Drosophila</i>	明目大蚕 <i>Antheraea frithi</i>	NC_027071	
		钩翅大蚕 <i>Antheraea assamensis</i>	NC_030270	
蚊科 Culicidae	按蚊属 <i>Anopheles</i>	天蚕 <i>Antheraea yamamai</i>	NC_012739	
		果蝇 <i>Drosophila incompta</i>	NC_025936	
		冈比亚按蚊 <i>Anopheles gambiae</i>	NC_002084	

1.2 方法

1.2.1 序列的碱基组成及变异分析 将数据库中下载的基因序列, 使用 MEGA6 软件^[12]进行序列比对、位点统计、碱基组成、碱基对频率替换、密码子使用偏好性以及遗传距离的计算。其中, 遗传距离的计算选用 Nucleotide 下的 Kimura 2-parameter 模型。分析核苷酸多样性和单倍型多样性均使用 DnaSP v5^[13]软件。使用 DAMBE 软件^[14]分析序列的替换饱和性(substitution saturation), 选择 GTR(general time reversible) 遗传距离作序列替换饱和性散点图。

1.2.2 系统发育分析 使用 MEGA6 软件^[12], 利用最大似然法(maximum likelihood, ML) 和邻接法(neighbor-joining, NJ) 对 16 种鳞翅目昆虫构建进化树, 其中果蝇 (*D. incompta*) 与冈比亚按蚊 (*A. gambiae*) 作为外群。其中, 最大似然法的核苷酸替代模型采用 GTR (general time reversible) +G+I (gamma distributed with invariant sites) 模型, 此模型依据 IQ-TREE v1.6.5 软件的 ModelFinder^[15]计算结果选择; 邻接法的核苷酸替代模型选择最大复何似然 (maximum composite likelihood) 模型。这两

种方法皆选择自助抽样法 (bootstrap method) 重复 1 000 次验证, 其余参数值为默认^[2]。

2 结果与分析

2.1 序列及变异分析

16种蚕蛾类昆虫的 *COXI* 基因序列经过序列比对, 分析序列密码子位点后显示, 保守位点 (conserved sites) 有 1 052 个, 约占总位点数的 68.8%; 变异位点 (variable sites) 有 478 个, 约占总位点数的 31.2%; 简约信息位点 (parsimony-

informative sites) 有 358 个, 约占总位点数的 23.3%。核苷酸多样性 (nucleotide diversity) 为 0.115 94, 单倍型多样性 (haplotype diversity) 为 1.000。序列碱基组成如下 (表 2) 所示, 第 3 位点的 AT 含量 (92.5%) 高于第 1 和第 2 位点 (61.3%、61.2%), 而第 3 位点的 GC 含量 (7.6%) 明显低于第 1 位点和第 2 位点的含量 (39.1%、38.9%)。分析 16 种碱基序列, 发现 AT 含量 (71.4%) 大于 GC 含量 (28.5%), 表明序列碱基具有明显的 A+T 偏倚性。

表 2 16 种昆虫的 *COXI* 基因在密码子位点上的平均碱基频率

Table 2 The average base frequencies of the *COXI* gene at the codon sites of 16 species of insects

密码子位点 Codon locus	平均碱基频率/% Average base composition					
	A	T	AT	C	G	CG
第 1 位点 1st	30.3	31	61.3	15.4	23.8	39.1
第 2 位点 2nd	19.2	42	61.2	23.4	15.5	38.9
第 3 位点 3rd	43.5	49	92.5	6.4	1.2	7.6
全部位点 All	31.0	40.4	71.4	15.0	13.5	28.5

表 3 碱基对替换值及 R 值

Table 3 The number of directional substitutions and R values of base pairs at codon sites

密码子位点 Codon locus	ii	si	sv	R	TC	CT	AG	GA	TA	AT	TG	GT	CA	AC	CG	GC	TT	AA	CC	GG	总计 Total
第 1 位点 1st	476	23	11	2.09	10	10	1	2	3	3	1	1	2	2	0	0	142	148	67	119	510
第 2 位点 2nd	505	2	3	0.67	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	212	96	118	79	510
第 3 位点 3rd	372	49	89	0.55	20	20	5	4	39	37	1	1	5	5	0	0	190	174	7	0	510
总计 Total	1 352	74	103	0.72	31	31	6	6	43	41	2	2	7	7	0	0	544	418	192	199	1 530

注: ii: 未发生替换的碱基对数量; si: 转换碱基对数量; sv: 颠换碱基对数量; R: 转换与颠换比值。

Note: ii: Number of base pairs that have not been replaced; si: Number of base pairs transition; sv: Number of base pairs trans-vers; R: the ratio of transition and trans-vers.

在 16 种蚕蛾类昆虫 *COXI* 基因序列的 1 530 个密码子位点上, 其中有 1 352 个位点没有发生突变, 另外, 序列中共发生了 74 个转换 (transition) 和 103 个颠换 (transversion), 主要发生在第 3 位点。其中, 转换主要发生在 C 与 T 之间, 而颠换多数发生在 A 与 T 之间; 同时, 从各密码子位点上来看, 第 3 位点发生替换的碱基数目最多, 第 1 位点次之, 第 2 位点最少 (表 3)。由此可知, 第 1 和第 2 位点具有较好的保守性, 第 3 位点最不稳定。R 值的平均值为 0.72, 初步判断核苷酸序列的变异尚未达到饱和。

利用 MEGA6 软件计算蚕蛾类 *COXI* 基因序列的密码子使用偏好性 (表 4), RSCU 值表示同义密码子相对使用率 (relative synonymous codon usage), 当密码子的 RSCU 值为 1 时, 表明无使用偏好; 当 RSCU 值在 1 以上, 表明有明显的密码子使用偏好性, 反之则无明显偏好^[16]。由表 4 可知, 16 种蚕蛾类的 *COXI* 基因序列表达时, 有 26 个密码子有明显地使

用偏好性, 无明显偏好性的密码子有 37 个。其中, RSCU 值在 3 以上, 即在编码氨基酸的时候, 主要被使用的密码子有编码亮氨酸 (L) 的 UUA、编码丝氨酸 (S) 的 UCU、编码精氨酸 (R) 的 CGA 以及编码甘氨酸 (G) 的 GGA, 其中, 密码子 UUA 的 RSCU 值最高, 达到了 4.19。RSCU 值为 0, 即在编码氨基酸时不被使用的密码子有编码丝氨酸 (S) 的 UCG、终止密码子 (*) UAA 及 UAG、编码谷氨酰胺 (Q) 的 CAG、编码半胱氨酸 (C) 的 UGC、编码精氨酸 (R) 的 CGC、编码丝氨酸 (S) 的 AGG。由此可以看出, 蚕蛾类昆虫 *COXI* 基因的密码子具有很强的使用偏好性。

2.2 个体间的遗传距离和替换饱和分析

遗传距离是衡量不同种群或物种之间基因差异程度的指标, 其中, 校正遗传距离是包括转换和替换分析的遗传距离。通过 MEGA6 软件分析可得到 16 种蚕蛾类昆虫的 *COXI* 基因的校正遗传距离 (表

5)。由表 5 可看出, 校正遗传距离在 0.003~0.177 之间, 这说明本研究涉及到的蚕蛾类昆虫之间亲缘关系近。其中, 蓖麻蚕(*Samia cynthia ricini*)与桑蠨(*Rondotia menciiana*)之间的遗传距离为 0.177, 则蓖麻蚕(*S. cynthia ricini*)与桑蠨(*R. menciiana*)的亲缘关

系相对较远; 蓖麻蚕(*S. cynthia ricini*)与宽带樗蚕(*S. canningi*)之间的遗传距离为 0.003, 表明蓖麻蚕(*S. cynthia ricini*)与宽带樗蚕(*S. canningi*)亲缘关系相对很近, 这与经典分类学上蓖麻蚕(*S. cynthia ricini*)为宽带樗蚕(*S. canningi*)亚种的结果一致。

表 4 *COXI* 基因密码子的使用偏好性
Table 4 *COXI* gene codon usage preference

密码子 Codon	比例 Count	同义密码子使用率 RSCU	密码子 Codon	比例 Count	同义密码子使用率 RSCU
UUU(F)	34.5	1.76	UCU(S)	17.1	3.07
UUC(F)	4.6	0.24	UCC(S)	3.6	0.64
UUA(L)	45.9	4.19	UCA(S)	14.3	2.55
UUG(L)	0.9	0.08	UCG(S)	0.0	0.00
CUU(L)	12.2	1.11	CCU(P)	12.6	1.98
CUC(L)	1.3	0.11	CCC(P)	4.3	0.68
CUA(L)	5.3	0.48	CCA(P)	8.1	1.27
CUG(L)	0.3	0.02	CCG(P)	0.4	0.07
AUU(I)	54.4	1.91	ACU(T)	13.6	1.87
AUC(I)	2.4	0.09	ACC(T)	2.1	0.28
AUA(M)	28.6	1.97	ACA(T)	13.3	1.82
AUG(M)	0.5	0.03	ACG(T)	0.2	0.03
GUU(V)	10.0	1.78	GCU(A)	17.8	2.39
GUC(V)	1.3	0.22	GCC(A)	2.4	0.32
GUA(V)	11.0	1.96	GCA(A)	9.4	1.27
GUG(V)	0.2	0.03	GCG(A)	0.2	0.03
UAU(Y)	15.8	1.61	UGU(C)	1.0	2.00
UAC(Y)	3.9	0.39	UGC(C)	0.0	0.00
UAA(*)	0.0	0.00	UGA(W)	13.9	1.98
UAG(*)	0.0	0.00	UGG(W)	0.1	0.02
CAU(H)	14.6	1.84	CGU(R)	1.1	0.50
CAC(H)	1.3	0.16	CGC(R)	0.0	0.00
CAA(Q)	9.0	2.00	CGA(R)	7.8	3.47
CAG(Q)	0.0	0.00	CGG(R)	0.1	0.03
AAU(N)	21.1	1.79	AGU(S)	3.2	0.57
AAC(N)	2.5	0.21	AGC(S)	0.3	0.06
AAA(K)	5.6	1.84	AGA(S)	6.2	1.11
AAG(K)	0.5	0.16	AGG(S)	0.0	0.00
GAU(D)	12.9	1.73	GGU(G)	7.7	0.68
GAC(D)	2.0	0.27	GGC(G)	0.7	0.06
GAA(E)	8.8	1.96	GGA(G)	34.5	3.03
GAG(E)	0.2	0.04	GGG(G)	2.6	0.23

Average# codons=510

注: F: 苯丙氨酸; L: 亮氨酸; I: 异亮氨酸; M: 甲硫氨酸; V: 缬氨酸; D: 天冬氨酸; E: 谷氨酸; C: 半胱氨酸; W: 色氨酸; R: 精氨酸; G: 甘氨酸; S: 丝氨酸; P: 脯氨酸; T: 苏氨酸; Y: 酪氨酸; A: 丙氨酸; H: 组氨酸; Q: 谷氨酰胺; N: 天冬酰胺; K: 赖氨酸; *: 无义密码子(终止密码子)。

Note: F:Phenylalanine; L: Leucine; I: Isoleucine; M:Methionine; V:Valine; D:Aspartic acid; E:Glutamic acid; C:Cysteine; W:Tryptophane; R:Arginine; G:Glycine; S:Serine; P:Proline; T:Threonine; Y:Tyrosine; A:Alanine; H:Histidine; Q:Glutamine; N:Asparagine; K:Lysine; *:nonsense codon(terminator codon).

其中校正遗传距离小于 0.100 的有：天蚕 (*Antheraea yamamai*)与柞蚕(*Antheraea pernyi*)、天蚕 (*A. yamamai*)与钩翅大蚕蛾(*Antheraea assama*)、天蚕 (*A. yamamai*)与明目大蚕(*Antheraea frithi*)、柞蚕(*A. pernyi*)与明目大蚕 (*A. frithi*)、樟蚕(*Eriogyna pyretorum*)与合目大蚕蛾(*Saturnia boisduvalii*)、柞蚕(*A.*

pernyi)与钩翅大蚕蛾(*Antheraea assama*)、家蚕(*B. mori*)与野桑蚕(*B. mandarina*)、家蚕(*B. mori*)与 *Bombyx huttoni*、野桑蚕(*B. mandarina*)与 *B. huttoni*、钩翅大蚕蛾(*A. assama*)与明目大蚕(*A. frithi*)，这表明以上物种两两间的亲缘关系较近。

表 5 基于 Kimura 2-parameter 模型的个体间校正遗传距离比较

Table 5 Corrected genetic distance comparison of inter-individual based on the Kimura 2-parameter mode

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
A														
B	0.120													
C	0.118	0.060												
D	0.114	0.106	0.100											
E	0.154	0.134	0.131	0.152										
F	0.155	0.132	0.136	0.154	0.031									
G	0.177	0.155	0.155	0.162	0.111	0.118								
H	0.107	0.084	0.087	0.114	0.147	0.141	0.158							
I	0.114	0.111	0.108	0.093	0.160	0.167	0.173	0.118						
J	0.151	0.139	0.137	0.157	0.074	0.076	0.125	0.142	0.162					
K	0.110	0.119	0.122	0.121	0.149	0.154	0.172	0.124	0.117	0.161				
L	0.124	0.116	0.115	0.121	0.150	0.157	0.175	0.112	0.114	0.165	0.129			
M	0.124	0.120	0.117	0.118	0.151	0.148	0.159	0.121	0.128	0.154	0.129	0.132		
N	0.003	0.120	0.118	0.113	0.154	0.153	0.176	0.108	0.113	0.153	0.110	0.125	0.125	
O	0.103	0.064	0.066	0.105	0.134	0.130	0.153	0.075	0.106	0.137	0.121	0.113	0.110	0.101
P	0.149	0.141	0.138	0.144	0.095	0.096	0.106	0.141	0.148	0.105	0.149	0.157	0.145	0.134

注：A:蓖麻蚕；B:天蚕；C:柞蚕；D:樟蚕；E:家蚕；F:野桑蚕；G:桑螵；H:钩翅大蚕蛾；I:合目大蚕蛾；J:*B. huttoni*；K:乌柏大蚕蛾；L:绿尾大蚕蛾；M:弧目大蚕蛾；N:宽带樗蚕；O:明目大蚕；P:戴氏褚蚕蛾。

Note: A:*S. cynthia ricini*; B:*A. yamamai*; C:*A. pernyi*; D:*E. pyretorum*; E:*B. mori*; F:*B. mandarina*; G:*R. menciana*; H:*A. assama*; I:*S. boisduvalii*; J:*B. huttoni*; K:*A. atlas*; L:*A. selene*; M:*N. haraldi*; N:*S. canningi*; O:*A. frithi*; P:*T. daii*.

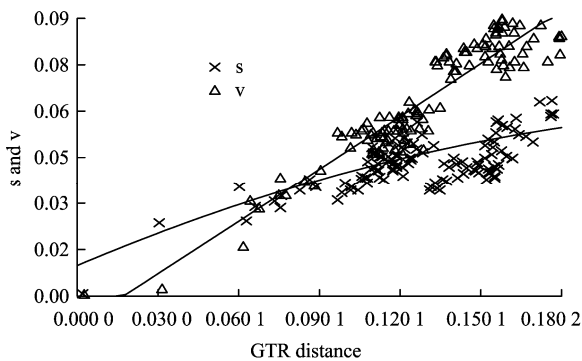


图 1 碱基替换的饱和性分析

Figure 1 Saturation analysis of base substitutions

使用 DAMBE 软件进行碱基替换的饱和性分析，得到 Iss 值及 Iss.c 值，并以遗传距离 (GTR)、转换遗传距离与颠换遗传距离作碱基替换饱和性分析散点图，其中，遗传距离作为横坐标，转换遗传

距离与颠换遗传距离作为纵坐标 (图 1)。碱基替换的饱和性分析显示，*Iss* 值(0.222 9) < *Iss.c* 值(0.794 7)，且 $P=0 < 0.05$ ，差异不显著，即碱基替换并未达到饱和，可以进行系统发育的分析。由图 1 可以看出，转换值与颠换值和遗传距离之间具有良好的线性关系，未出现平台。随着遗传距离的增加，转换值上升趋势减缓，颠换值上升趋势几乎不变。在遗传距离介于 0.060 1 与 0.090 1 之间的时候，颠换值与转换值相交，并开始超过转换值。

2.3 系统发育树的分析

采用邻接法 (neighbor-joining method, NJ) 和最大似然法(maximum likelihood, ML)构建进化树，结果 (图 2 和图 3) 表明，两种进化树的拓扑结构相似。这里主要分析 ML 法构建的系统发育树，该发育树的分支关系显示，在大蚕蛾科 A 支中，柞蚕 (*A.*

pernyi) 先与天蚕 (*A. yamamai*) 聚在一起, 再与明目大蚕 (*A. frithi*) 聚在一起, 接着它们又与钩翅大蚕蛾 (*A. assama*) 形成并列分支, 且节点支持率都很高 (>80%)。在 B 支中, 樟蚕 (*E. pyretorum*) 与合目大蚕蛾 (*S. boisduvalii*) 聚为一支, 节点支持率为 86%, 说明樟蚕属与目大蚕蛾属的亲缘关系较近。在 C 支中, 蓖麻蚕 (*S. cynthia ricini*) 先与宽带柞蚕 (*S. canningi*) 聚为一支, 节点的支持率为 100%, 再与乌柏大蚕蛾 (*A. atlas*) 形成并列分支, 且节点

的支持率也很高 (85%), 可知柞蚕蛾属与巨大蚕蛾属的亲缘关系比较近。A、B、C 三支聚在一起, 再与弧目大蚕蛾 (*N. haraldi*) 聚在一起。在蚕蛾科 D 支中, 戴氏褚蚕蛾 (*T. daii*) 与桑螵 (*R. menciana*) 聚在一起, 置信度为 76%; 在 E 支中, 野桑蚕 (*B. mandarina*) 与家蚕 (*B. mori*) 聚为一支, 置信度为 100%; 接着又与 *B. huttoni* 聚为一支, 置信度为 99%, 说明家蚕蛾属与野蚕蛾属的亲缘关系非常近。用 NJ 法构建的进化树与 ML 法构建的进化树结果相似。

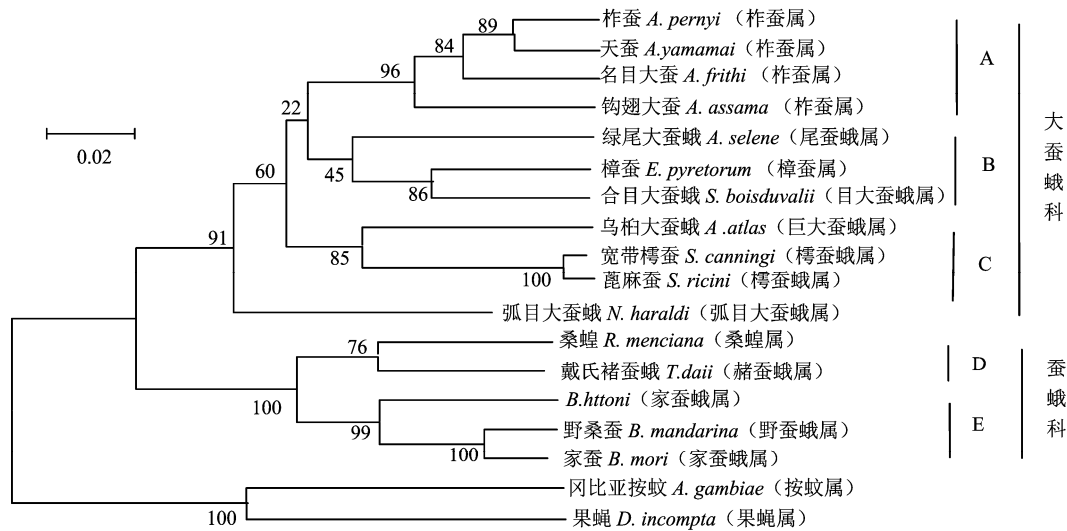


图 2 基于 *COXI* 基因构建的最大似然系统发育树

Figure 2 The maximum likelihood consensus tree based on *COXI* gene sequence data

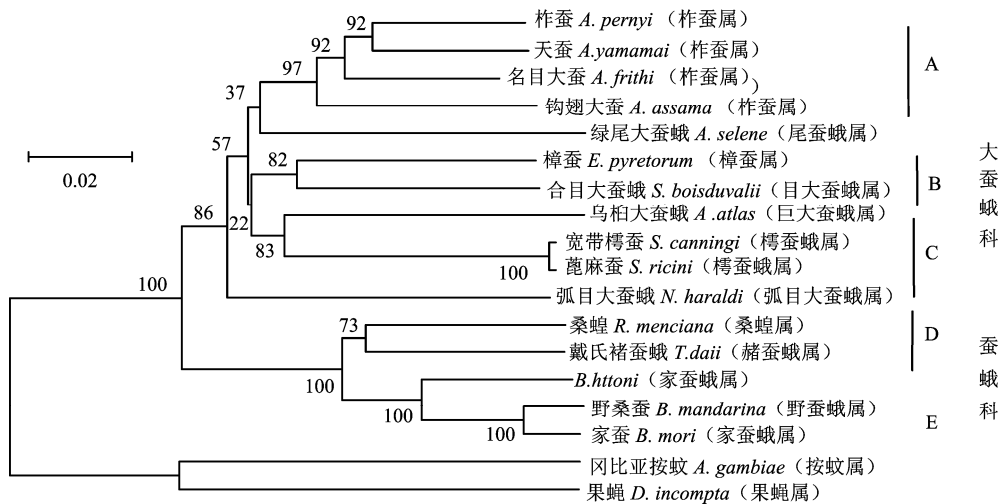


图 3 基于 *COXI* 基因构建的邻接系统发育树

Figure 3 The neighbor-joining consensus tree based on *COXI* gene sequence data

首先, 根据生物分类学, 蓖麻蚕 (*S. cynthia ricini*) 是宽带柞蚕 (*S. canningi*) 的亚种; 天蚕 (*A. yamamai*) 是柞蚕 (*A. pernyi*) 的亚种^[17]; 家蚕 (*B. mori*) 是野桑蚕 (*B. mandarina*) 的亚种^[18], 系统发育树的分支结果符合这一分类特征。其次, 根据系

统发育树结果显示: 在大蚕蛾科 B 支中, 樟蚕 (*E. pyretorum*) 与合目大蚕蛾 (*S. boisduvalii*) 也为姊妹群, 亲缘关系较近。在 C 支中, 乌柏大蚕蛾 (*A. atlas*) 和柞蚕蛾属的两种昆虫蓖麻蚕 (*S. cynthia ricini*) 与宽带柞蚕 (*S. canningi*) 互为姊妹群, 拥

有最共同祖先 (last common ancestor), 说明它们的亲缘关系较近。在蚕蛾科 D 支中, 桑蠃 (*R. menciiana*) 与戴氏褚蚕蛾 (*T. daii*) 拥有最近共同祖先, 它们为姊妹群, 亲缘关系较近; E 支中的野桑蚕 (*B. mandarina*) 靠近外群, 说明它年代久远。这些结果与前人的研究成果一致^[19]。

经过两个系统发育树对比显示, 绿尾大蚕蛾 (*A. selene*) 的亲缘关系不明确。在 ML 发育树中, 它位于大蚕蛾科 B 分支中, 但置信度低于 50%; 在 NJ 发育树中, 它位于大蚕蛾科 A 分支中, 置信度同样低于 50%。亲缘关系不明确的还有大蚕蛾科中 A 与 B 两个分支之间的关系。在 NJ 发育树中, B 支与 C 支虽聚在一起, 但置信度也低于 50%。在 ML 发育树中, 大蚕蛾科 A 支、B 支与 C 支聚为的一支置信度也不高, 为 60%。这初步说明大蚕蛾科内属与属之间的亲缘关系并不明晰, 还需要作进一步探究以确定。

3 讨论与结论

本研究利用蚕蛾类昆虫的线粒体 *COXI* 基因, 通过生物软件分析数据, 对其系统发育信息进行分析。结果表明, 蚕蛾类昆虫的 *COXI* 基因序列的 AT 含量 (71.4%) 远高于 GC 含量 (28.5%), 具有明显的 AT 偏倚性, 这符合房守敏等^[1]所表明的昆虫核苷酸组成结果。密码子的第 3 位点上 AT 含量最高, 碱基在密码子 3 个位点上的组成都有强烈偏倚性, 且在第 3 位点上发生转换和颠换的次数最多。同时, 碱基对定向替换分析表明, 第 3 位点发生替换的碱基数目最多, 第 1 位点次之, 第 2 位点最少。这说明了第 1 和第 2 位点具有较好的保守性, 第 3 位点承受的进化压力较少。转换主要在 C 与 T 之间发生, 颠换多数发生在 A 与 T 之间。

对 *COXI* 基因序列密码子偏好分析显示, 有 26 个密码子有明显的同义密码子使用偏好性, 其中, 编码亮氨酸 (L) 的 UUA、编码丝氨酸 (S) 的 UCU、编码精氨酸 (R) 的 CGA 以及编码甘氨酸 (G) 的 GGA 有很强地使用偏好性; 无明显偏好性的密码子有 37 个, 其中, 编码丝氨酸 (S) 的 UCG、终止密码子 (*)UAA 及 UAG、编码谷氨酰胺 (Q) 的 CAG、编码半胱氨酸 (C) 的 UGC、编码精氨酸 (R) 的 CGC、编码丝氨酸 (S) 的 AGG 在编码氨基酸时基本不被使用。

遗传距离的计算显示, 本研究涉及到的蚕蛾类昆虫之间亲缘关系较近, 其中, 最大值出现在蓖麻蚕 (*S. cynthia ricini*) 与桑蠃 (*R. menciiana*) 之间, 为

0.177; 最小值出现在蓖麻蚕 (*S. cynthia ricini*) 与宽带柞蚕 (*S. canningi*) 之间, 为 0.003。这表明在本研究涉及到的蚕蛾类昆虫中, 蓖麻蚕 (*S. cynthia ricini*) 与桑蠃 (*R. menciiana*) 亲缘关系相对最远, 蓖麻蚕 (*S. cynthia ricini*) 与宽带柞蚕 (*S. canningi*) 亲缘关系相对最近。

碱基替换的饱和性分析显示, 碱基替换并未达到饱和, 转换值与颠换值和遗传距离之间具有良好的线性关系, 未出现平台。随着遗传距离的增加, 转换值上升趋势有所减缓, 颠换值上升趋势几乎不变。在遗传距离介于 0.060 1 与 0.090 1 之间的时候, 颠换值与转换值相交, 并开始超过转换值。

本研究验证了在生物分类学中, 柞蚕蛾属的蓖麻蚕 (*S. cynthia ricini*) 与宽带柞蚕 (*S. canningi*)、柞蚕属的天蚕 (*A. yamamai*) 与柞蚕 (*A. pernyi*)、家蚕蛾属的家蚕 (*B. mori*) 与野桑蚕 (*B. mandarina*) 3 个亚种关系; 其次, 根据系统发育树, 在大蚕蛾科中, 巨大蚕蛾属的乌柏大蚕蛾 (*A. atlas*) 与柞蚕蛾属的蓖麻蚕 (*S. cynthia ricini*) 与、宽带柞蚕 (*S. canningi*) 的亲缘关系较近; 樟蚕属的樟蚕 (*E. pyretorum*) 与目大蚕蛾属的合目大蚕蛾 (*S. boisduvalii*) 亲缘关系较近。在蚕蛾科中, 桑蠃属的桑蠃 (*R. menciiana*) 与褚蚕蛾属的戴氏褚蚕蛾 (*T. daii*) 的亲缘关系较近。这与孙伟等人研究成果一致^[19]。

但是, 在发育树中, 绿尾大蚕蛾 (*A. selene*) 的亲缘关系尚不明确, 且本研究大蚕蛾科中的其余属的属间发生关系也不够明确, 可能原因是本研究所选不同分类阶元的昆虫数量不够多, 且所选取的 16 种蚕蛾类昆虫在形态特征上差异较大。因此, 蚕蛾类昆虫的系统发生关系仍需要作进一步研究。

目前, 蚕蛾类昆虫在系统发育方面的研究还比较少, 其分类学地位的划分以及系统发生地位还有待完善。虽然中国是最早拥有养蚕技术的国家, 但当中存在着大量的蚕蛾类昆虫相关研究的空白。由于其分布地理位置广, 相应的给研究也造成了一定的困难; 由于某些种类的外部形态特征差异小, 至今在分类及演化地位上还存在分歧^[3]。随着现今分子生物学水平上的研究手段成为主要趋势, 对其进行分子系统发育的分析是不可或缺的手段。本实验结果表明, 蚕蛾类昆虫的 *COXI* 基因有明显的 AT 偏倚性, 且在第 3 位点上最富集; 碱基颠换多于转换, 碱基转换主要发生在 T、C 之间, 碱基颠换主要发生在 T、A 之间, 且在第 3 位点上发生碱基替换的次数最多, 证明第 3 位点不稳定, 进化压力小; 蓖麻蚕与桑蠃的亲缘关系最远, 与宽带柞蚕的亲缘关系最

近; 在大蚕蛾科中, 巨大蚕蛾属的乌柏大蚕蛾 (*A. atlas*) 与栲蚕蛾属的蓖麻蚕 (*S. cynthia ricini*) 与宽带栲蚕 (*S. canningi*) 的亲缘关系较近; 樟蚕属的樟蚕 (*E. pyretorum*) 与目大蚕蛾属的合目大蚕蛾 (*S. boisduvalii*) 亲缘关系较近。在蚕蛾科中, 桑螵属的桑螵 (*R. menciiana*) 与赭蚕蛾属的戴氏赭蚕蛾 (*T. daii*) 的亲缘关系较近; 绿尾大蚕蛾 (*A. selene*) 的亲缘关系尚不明确, 且本研究大蚕蛾科中的其余属的属间发生关系也不够明确, 可能原因是本研究所选不同分类阶元的昆虫数量不够多, 且所选取的 16 种蚕蛾类昆虫在形态特征上差异较大, 因此, 对蚕蛾类昆虫的系统发生关系仍需要作进一步的研究。

在进一步研究中, 应该增加用于研究的昆虫科下分类阶元的种类及数量, 同时也可增加用于分析的分子标记, 以便于更全面地分析蚕蛾类昆虫的系统发育关系。

参考文献:

- [1] 房守敏, 张烈, 鲁成, 等. 蚕类昆虫线粒体 DNA 研究及其在起源与进化研究中的应用[J]. 昆虫知识, 2010, 47(3): 439-445.
- [2] TUSKES P M, COLLINS M L, TUTTLE J P. The wild silk moths of North America Cornell[J]. Cornell, 1996, 49(6): 565.
- [3] 罗雪, 谷星石, 王星. 中国蚕蛾科昆虫系统分类学研究进展[J]. 华中昆虫研究, 2016, 12: 55-64.
- [4] DESALLE R, FREEDMAN T, PRAGER E M, et al. Tempo and mode of sequence evolution in mitochondrial DNA of Hawaiian *Drosophila*[J]. J Mol Evol, 1987, 26(1/2): 157-164.
- [5] 黄原. 分子系统学: 原理、方法及应用[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [6] 张亚平, 施立明. 动物线粒体 DNA 多态性的研究概况[J]. 动物学研究, 1992, 13(3): 289-298.
- [7] 张顺, 廖健, 郭昱嵩, 等. 基于线粒体 *COXI* 基因序列的弹涂鱼类系统进化关系[J]. 广东海洋大学学报, 2017, 37(1): 21-27.
- [8] 汪爱民, 洪桂云, 魏兆军. 二化螟线粒体 *COXI* 基因的克隆、序列测定和分子系统学分析[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(21): 12719-12721.
- [9] 戴立上. 鳞翅目三种不同科的昆虫线粒体基因组学分析[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2016.
- [10] 钟健, 刘增虎, 杨伟克, 等. 琥珀蚕线粒体全基因组测序及序列分析[J]. 昆虫学报, 2017, 60(8): 936-949.
- [11] 赵怡霏, 谷星石, 任葛枫, 等. 戴氏赭蚕蛾线粒体基因组全序列测定及分析(鳞翅目: 蚕蛾科)[J]. 昆虫分类学报, 2017, 39(3): 223-237.
- [12] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. Mol Biol Evol, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [13] LIBRADO P, ROZAS J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. Bioinformatics, 2009, 25(11): 1451-1452.
- [14] KNOOP V. The phylogenetic handbook: a practical approach to DNA and protein phylogeny [M]// SALEMI M, VANDAMME A M. The phylogenetic handbook: a practical approach to DNA and protein phylogeny. Cambridge: Cambridge University Press, 2003: 354-355.
- [15] KALYAANAMOORTHY S, MINH B Q, TKF W. Modle Finder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates[J]. Nat Methods, 2017, 14(6): 587-589.
- [16] 晁岳恩, 吴政卿, 杨会民, 等. 11 种植物 psbA 基因的密码子偏好性及聚类分析[J]. 核农学报, 2011, 25(5): 927-932.
- [17] MAHENDRAN B, GHOSH S K, KUNDU S C. Molecular phylogeny of silk producing insects based on internal transcribed spacer DNA1[J]. BMB Reports, 2006, 39(5): 522-529.
- [18] YUKUHIRO K, SEZUTSU H, ITOH M, et al. Significant levels of sequence divergence and gene rearrangements have occurred between the mitochondrial genomes of the wild mulberry silkworm, *Bombyx mandarina*, and its close relative, the domesticated silkworm, *Bombyx mori*[J]. Mol Biol Evol, 2002, 19(8): 1385-1389.
- [19] 孙伟, 于红松, 沈以红, 等. 蚕系统发生及进化历史分析[J]. 中国科学(生命科学), 2012, 42(6): 489-502.