

核桃举肢蛾线粒体 CO I 和 Cytb 基因片段序列分析

王琦琦,陈丹丹,唐光辉*

(西北农林科技大学 林学院,陕西 杨陵 712100)

摘 要:核桃举肢蛾(*Atrijuglans hetaohei*)是危害核桃果实的主要害虫,严重影响核桃的产量和商品价值。在最新的形态学分类上,核桃举肢蛾属于鳞翅目、麦蛾总科、黑展足蛾属。通过同源序列比对探讨利用 DNA 条形码技术(DNA barcoding)对核桃举肢蛾进行分类鉴定的准确性。运用 2 对通用引物分别扩增核桃举肢蛾线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I(CO I)基因和细胞色素 b(Cytb)基因片段,并与鳞翅目麦蛾总科、巢蛾总科、凤蝶总科、螟蛾总科等昆虫的同源片段进行碱基组成多样性和系统进化分析,扩增得到核桃举肢蛾 CO I 基因 664 bp 片段和 Cytb 基因 479 bp 片段。结果表明:核桃举肢蛾线粒体 CO I 基因片段中,A、T、G 和 C 4 种核苷酸的含量分别为 29.5%、39.4%、15.1%和 16.1%,A+T 的含量(68.9%)明显高于 G+C 含量(31.1%),存在显著的 AT 使用倾向性。在 Cytb 基因片段中,A、T、G 和 C 4 种核苷酸的含量分别为 33.4%、41.5%、10.2%和 14.8%,A+T 的含量为 74.9%,也明显高于 G+C 含量(26%)。两段序列都以 T-A 间颠换和 T-C 间转换为主要替换方式,且密码子第 2 位点保守性最强,第 3 位点变异率最高。基于 CO I 和 Cytb 基因片段构建的 NJ 系统进化树均显示核桃举肢蛾与麦蛾总科昆虫处于同一个分支之下。利用 DNA 条形码技术得到的核桃举肢蛾分子生物学分类结果与传统的形态学分类结果一致。

关键词:核桃举肢蛾;细胞色素 C 氧化酶亚基 I;细胞色素 b;遗传多样性;系统进化

中图分类号:S763.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2016)01-0145-08

Sequence Analysis of the Fragments of CO I and Cytb Genes from *Atrijuglans hetaohei*

WANG Qi-qi, Chen Dan-dan, TANG Guang-hui*

(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: *Atrijuglans hetaohei* Yang is the main pest of walnut fruits, affecting the yield and the commercial value of walnut seriously. In the latest morphological classification, *A. hetaohei* belongs to Lepidoptera, Gelechioidea, *Atrijuglans*. In order to investigate the accuracy of *A. hetaohei* identification by the method of DNA barcoding technology, we used homologous sequence alignment and analysis. Mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I (CO I) gene and cytochrome b (Cytb) gene fragments were amplified with two pairs of universal primers, and subsequently were analyzed on their base composition diversity and phylogenesis with homologous fragments of Gelechioidea, Yponomeutoidea, Papilionoidea, Pyraloidea, etc. Nucleotide sequences of 664 bp for CO I gene and 479 bp for Cytb gene were obtained, respectively. The result of sequence analysis showed that in CO I gene sequence of *A. hetaohei*, the contents of A, T, G and C nucleotides were 29.5%, 39.4%, 15.1% and 16.1%, respectively, and the content of A+T (68.9%) was obviously higher than that of G+C (31.1%), indicating a strong AT bias. The result of sequence analysis in Cytb gene sequence of *A. hetaohei* showed that the contents of A, T, G and C nucleotides were 33.4%, 41.5%, 10.2% and 14.8%, respectively, and the content of A+T (74.9%) was obviously higher than that of G+C (26%). The two segments of sequence were mainly replaced by T-A interconversion and T-C interconversion, and the second codon position was the most conservative, and the third codon position was the highest variation rate. The NJ phylogenetic tree constructed based on CO I and Cytb gene fragments showed that *Atrijuglans hetaohei* and the insects of the family Gelechiidae were in the same branch. The molecular biology classification results of *Atrijuglans hetaohei* obtained by DNA barcoding technology were consistent with the traditional morphological classification results.

收稿日期:2015-02-09 修回日期:2015-04-02

基金项目:国家自然科学基金项目(31270690);西北农林科技大学校基金项目(ZD2012011)。

作者简介:王琦琦,女,在读硕士,研究方向:森林昆虫。E-mail:qqwle2009@163.com

*通信作者:唐光辉,男,副教授,硕士生导师,研究方向:林业有害生物防治和昆虫化学生态。E-mail:huitang621@126.com

41.5%,10.2% and 14.8%, respectively, and the content of A+T was 74.9%, which was also obviously higher than that of G+C (26%). In these two sequences, the main base substitution mode was T-A transversion and T-C transition, and the second codon was the most conservative site, while the third codon had the highest mutation rate. The constructed NJ phylogenetic trees based on CO I and Cytb gene sequences showed that *A. hetaohei* and Gelechioidea insects formed a monophyletic clade. The classification result of *A. hetaohei* by means of DNA barcoding technology is in accordance with the traditional morphological classification.

Key words: *Atrijuglans hetaohei* Yang; cytochrome C oxidase subunit I; cytochrome b; genetic diversity; phylogenesis

核桃举肢蛾(*Atrijuglans hetaohei*), 又名核桃黑, 核桃展足蛾。关于核桃举肢蛾的分类地位, 最初将其归为鳞翅目(Lepidoptera)、巢蛾总科(Yponomeutoidea)、举肢蛾科(Heliodinidae)^[1], 后经李后魂^[2]等根据其形态学特征重新鉴定, 将核桃举肢蛾归入麦蛾总科(Gelechioidea)、织蛾科(Oecophoridae)、展足蛾亚科(Stathmopodinae)、黑展足蛾属(*Atrijuglans*)。核桃举肢蛾是对核桃危害最大的害虫之一, 在我国山东、四川、贵州、山西、陕西、河南、河北等核桃产区普遍发生, 严重影响核桃的产量和商业价值。目前, 关于核桃举肢蛾的研究主要在生物学特性^[3]、种群动态^[4-5]、生化防治^[6-7]以及性信息素^[8]等几个方面, 而有关其线粒体基因方面的研究国内外未见报道。

20 世纪 90 年代以来, 随着 PCR 技术的日趋完善和分子生化技术的快速发展, 运用线粒体相关基因为分子标记基因的 DNA 条形码技术得到广泛应用。线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA) 作为研究 DNA 复制和转录的良好模型, 同时也是目前昆虫遗传多样性和系统进化研究广泛使用的重要分子标记之一, 它具有较核 DNA 更快的进化速率, 遗传过程中不发生重组、倒位、易位等突变, 严格遵守母系遗传等特点^[9-11]。其中, 细胞色素 c 氧化酶亚基 I(cytochrome C oxidase subunit I, CO I) 和细胞色素 b(Cytb) 序列是线粒体 13 个蛋白质编码基因中结构和功能研究最为清楚的基因, 其进化速度适中, 相对保守的同时具有足够的变异, 作为 DNA 的主要标记, 在昆虫遗传进化研究中已有较多的应用^[12-15]。

本研究通过 PCR 扩增和克隆得到核桃举肢蛾 CO I 基因和 Cytb 基因序列片段, 并对核桃举肢蛾 CO I 和 Cytb 基因片段分别进行碱基多样性及系统进化关系分析, 并通过 DNA 条形码数据对核桃举肢蛾进行快速、准确的识别, 为进一步深入研究其遗传进化、种群发生及综合防治打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用核桃举肢蛾成虫系 2013 年 6 月上旬采集于陕西省商洛市山阳县郭家村西北农林科技大学山阳核桃板栗试验示范站核桃园内(109.88°E、33.53°N), 样品采集后即放入无水乙醇浸泡, -20℃条件下保存。

1.2 方法

1.2.1 核桃举肢蛾线粒体 DNA 的制备 取 5 头核桃举肢蛾成年雄虫, 分别利用基因组 DNA 抽提试剂盒(北京天根生化科技公司), 依照操作说明进行总 DNA 提取, -20℃条件下保存备用。

1.2.2 PCR 扩增 CO I 和 Cytb 基因片段 根据已发表鳞翅目昆虫测序中所使用的引物, 选取 CO I 通用引物 CO IF 和 CO IR 以及 Cytb 通用引物 CytbF 和 CytbR(表 1)^[16], 由上海生工生物工程有限公司合成。

表 1 扩增 CO I 和 Cytb 基因所用引物
Table 1 Primers used for amplification of the CO I and Cytb genes

引物名称	引物序列(5-3)	退火温度/℃
CO IF	GGTCAACAAATCATAAAGATATTG	55
CO IR	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAAT	
CytbF	TATGTACTACCATGAGGACAAATAT	47
CytbR	ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT	

PCR 反应在 Eppendorf Mastercycler nexus PCR 仪上进行, 以核桃举肢蛾总 DNA 为模板, 扩增反应体积为 50 μL; 总 DNA 模板 200 ng, 10×PCR Buffer 5.0 μL, MgCl₂ (2.5 mol·L⁻¹) 3.0 μL, dNTP 4.0 μL, 上下游引物(25 μmol·L⁻¹) 1.0 μL, 1 U Taq DNA 聚合酶[5 U·μL⁻¹, 宝生物工程(大连)有限公司生产], 加纯水补足。

PCR 反应循环参数为: 94℃预变性 2 min; 94℃变性 30 s, 退火 30 s(CO I, 55℃; Cytb, 47℃), 72℃延伸 1 min, 共 35 个循环; 72℃延伸 10 min 后 4℃

保存。

扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后用凝胶成像仪进行检测。

PCR 扩增产物用 DNA 片段凝胶回收试剂盒(北京天根生化科技公司)进行胶回收纯化后,使用 Solution I[宝生物工程(大连)有限公司生产]将纯化产物与 pMD19-T 载体[宝生物工程(大连)有限公司生产]连接,涂布平板,37℃过夜培养。挑选阳性菌落进行液体扩大培养,送上海生工生物工程技术服务有限公司进行双向测序。

1.2.3 数据分析 将测序结果用 SeqMAN 软件进行拼接和比对,得到目的基因片段,并在 GenBank 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中进行 BLAST 相似性检索,利用 ClustalX^[17] 将克隆得到的核桃举肢蛾 CO I 和 Cytb 基因片段序列分别与 BLAST 检索中得到的鳞翅目昆虫的 CO I 基因和 Cytb 基因进行多重对位排列。将比对结果中两端未对齐的部分剪切掉,使所有片段长度一致,以便于进行数据分析。采用 MEGA 5.0 软件^[18] 分析所有昆虫的碱基组成、变异位点、简约信息位点等,并计算个体间的遗传距离等,其中,AT 偏倚度(AT-skew)和 GC 偏倚度(GC-skew)的计算公式分别为:

$$AT-skew=(A-T)/(A+T)$$

$$GC-skew=(G-C)/(G+C)$$

运用邻接法(neighbor-joining, NJ),利用 Kimura 2-parameter 模型构建核桃举肢蛾与其他鳞翅目昆虫基于 CO I 基因和 Cytb 基因片段序列的系统发育树,Bootstrap 置信值估算重复次数为 1 000 次。

2 结果与分析

2.1 CO I 和 Cytb 基因的克隆与鉴定

以引物 CO IF/CO IR 和 CytbF/CytbR 分别扩增得到 CO I 和 Cytb 基因片段,回收、纯化后克隆测序,去除上下游引物和两端不稳定序列并分别进行比对,最终得到核桃举肢蛾的 CO I 基因片段 664 bp 和 Cytb 基因片段 479 bp。将 CO I 和 Cytb 序列分别在 GenBank 进行 BLAST 搜索,比对结果中与鳞翅目昆虫对应基因片段都具有极高的相似性。

2.2 碱基组成特点分析

2.2.1 CO I 基因的碱基组成特点分析 将获得的 CO I 基因片段在 GenBank 中进行 BLAST 搜索后得到鳞翅目蚕蛾总科、凤蝶总科、麦蛾总科、巢蛾总科等 6 个总科共 34 条同源序列,分别属于 29 种昆虫。包括核桃举肢蛾在内的 30 种昆虫的 35 条序列碱基组成特点分析结果如表 2 所示,在所有的 CO I

序列中,A、T、G、C 碱基的平均含量分别为 30.5%、39.8%、14.7%和 15.1%。A+T 的含量为 70.3%,明显高于 G+C 的含量(29.8%)。其中,核桃举肢蛾 CO I 基因片段的 A、T、G、C 含量分别为 29.5%、39.4%、15.1%和 16.0%。A+T 的含量为 68.9%,也明显高于 G+C 含量(31.1%)。

2.2.2 Cytb 基因的碱基组成特点分析 将获得的 Cytb 基因片段在 GenBank 中进行 BLAST 搜索后得到鳞翅目麦蛾总科、凤蝶总科、夜蛾总科等 5 个总科共 32 条同源序列,分属于 21 种昆虫,包括核桃举肢蛾在内的所有序列碱基组成特点分析结果如表 3 所示,全部 Cytb 序列的 A、T、G、C 碱基的平均含量分别为 32.9%、41.7%、10.4%和 15%。A+T 的含量为 74.6%,明显高于 G+C 的含量(25.4%)。其中,核桃举肢蛾 Cytb 基因片段的 A、T、G、C 含量分别为 33.4%、41.5%、10.2%和 14.8%。A+T 的含量为 74.9%,也明显高于 G+C 含量(26%)。

2.3 遗传多样性和碱基替换分析

2.3.1 基于 CO I 基因序列的遗传多样性和碱基替换分析 利用 MEGA 5.0 软件分析核桃举肢蛾及其他 29 种鳞翅目昆虫 CO I 基因的总体平均遗传距离为 11.8%。其中,核桃举肢蛾与麦蛾总科的 *Thudaca orthodroma* 遗传距离最小,为 9.4%;与巢蛾总科的 *Heliodines tripunctella* 遗传距离最大,为 16.2%。种间遗传距离最小为 0.3%,发生在凤蝶总科的 *Apatura metis* 和 *Apatura ilia* 之间。螟蛾总科的 *Paracymoriza prodigalis* 与巢蛾总科的 *Heliodines tripunctella* 的种间遗传距离最大,为 17.8%。

基于 CO I 基因序列的核桃举肢蛾及其他 29 种昆虫的碱基替换模式中,颠换明显高于转换,R 值为 0.60,如表 4 所示。碱基颠换主要发生在 T-A 之间,占颠换总数的 84.09%,其次是 C-A 间(9.1%),T-G 颠换最小,为 4.54%,无 C-G 间颠换;转换主要发生在 T-C 之间,占转换总数的 80.77%,而 A-G 之间转换占转换总数的 19.23%。

对包括核桃举肢蛾在内的 30 种昆虫的 CO I 基因序列的特殊位点分布分析,共检测到变异位点 239 个,变异率为 37.11%,其中简约信息位点 198 个,单突变位点 41 个(表 5)。密码子第 2 位碱基保守性最强,其次为第 1 位点,密码子第 3 位的变异性最强,变异率为 83.64%。

以核桃举肢蛾及其他 29 种昆虫的 CO I 基因两两间遗传距离为横坐标,碱基的替换数为纵坐标建立碱基替换饱和度分析趋势图(图 1),CO I 基因序列的碱基转换数和颠换数随种间遗传距离的增大呈明显上升趋势。

表 2 核桃举肢蛾及其他 29 种昆虫 CO I 基因序列的碱基组成特点												
Table 2 Base composition characteristics of CO I gene sequences from <i>A. hetaohei</i> and 29 other insect species												
编号	物种名称及分类阶元			序列 长度/bp	碱基含量/%				AT 偏倚度	GC 偏倚度	GenBank 登录号	
					T	C	A	G				
1	凤蝶总科	凤蝶科	<i>Luehdoudia taibai</i>	644.0	39.8	15.5	30.4	14.3	−0.132 74	−0.041 67	KC952673	
2			<i>L. chinensis</i>	644.0	40.5	14.6	30.6	14.3	−0.139 74	−0.010 75	EU622524	
3		蛱蝶科	<i>Apature metis</i>	644.0	39.3	14.9	30.9	14.9	−0.119 47	−0.000 00	JF801742	
4			<i>A. ilia</i>	644.0	39.3	14.9	30.6	15.2	−0.124 44	0.010 31	JF437925	
5			<i>Heliconius hecale</i>	644.0	40.2	13.8	31.5	14.4	−0.121 21	0.021 98	KM068091	
6			<i>H. pacheus</i>	644.0	40.8	13.8	30.3	15.1	−0.148 47	0.043 01	KM014809	
7	蚕蛾总科	大蚕蛾科	<i>Samia Cynthia</i>	644.0	40.4	16.0	28.6	15.1	−0.171 17	−0.030 00	JN215366	
8			<i>Rhodinia fugax</i>	644.0	39.9	15.2	30.3	14.6	−0.137 17	−0.020 83	GU663930	
9		<i>R. fugax</i>	644.0	40.1	15.1	30.3	14.6	−0.139 07	−0.015 71	GU702872		
10		<i>R. fugax</i>	644.0	40.1	15.1	30.3	14.6	−0.139 07	−0.015 71	AB015867		
11		天蚕蛾科	<i>Antheraea frithi</i>	644.0	39.8	15.8	29.8	14.6	−0.142 86	−0.040 82	AB533563	
12			<i>A. frithi</i>	644.0	40.1	15.5	29.8	14.6	−0.146 67	−0.030 93	KJ676596	
13	螟蛾总科	草螟科	<i>Paracymoriza prodigalis</i>	644.0	39.0	14.8	31.5	14.8	−0.105 73	0.000 00	JX144892	
14			<i>P. prodigalis</i>	644.0	40.8	13.7	30.6	14.9	−0.143 48	−0.043 48	KF859965	
15	夜蛾总科	夜蛾科	<i>Masalia galathae</i>	644.0	41.3	13.2	31.2	14.3	−0.139 19	0.039 55	EU768924	
16			<i>Heliocheilus eodora</i>	644.0	39.6	14.1	31.8	14.4	−0.108 70	0.010 87	EU768909	
17			<i>Helicoverpa assulta</i>	644.0	40.7	14.4	30.3	14.6	−0.146 61	0.005 35	EU768937	
18			<i>M. decorata</i>	644.0	40.1	14.3	31.1	14.6	−0.126 64	0.010 75	EU768923	
19			<i>Heliocheilus</i> sp.	644.0	39.6	13.8	31.1	14.4	−0.103 90	0.021 98	EU768914	
20			<i>Helicoverpa armigera</i>	644.0	40.2	14.6	30.7	14.4	−0.133 48	−0.005 35	GU188273	
21	巢蛾总科	举肢蛾科	<i>Heliodines tripunctella</i>	644.0	37.0	16.1	32.0	14.9	−0.072 07	−0.040 00	KF492395	
22			<i>H. nyctaginella</i>	644.0	37.6	14.8	32.5	15.2	−0.073 17	0.015 54	KF492394	
23			<i>H. ionis</i>	644.0	38.7	15.8	30.7	14.8	−0.114 09	−0.035 53	KF492393	
24			<i>Epicroesa metallifera</i>	644.0	39.4	15.4	30.3	14.9	−0.131 40	−0.015 38	KF491708	
25			<i>Neoheliodines cliffordii</i>	644.0	38.0	14.9	31.4	15.7	−0.096 20	0.025 38	KJ163861	
26	麦蛾总科	小潜蛾科	<i>Promalactis suzukiella</i>	644.0	39.4	14.1	31.4	15.1	−0.114 04	0.031 91	NC026697	
27			<i>P. suzukiella</i>	644.0	39.4	14.1	31.4	15.1	−0.114 04	0.031 91	KM875542	
28		草潜蛾科	<i>Stephensia brunnichella</i>	644.0	38.5	15.5	30.9	15.1	−0.109 62	−0.015 23	JF818793	
29			织蛾科	<i>Thudaca orthodroma</i>	644.0	39.3	14.4	31.7	14.6	−0.107 22	0.005 35	KF394221
30				<i>Acraephnes inscripta</i>	644.0	38.8	14.9	31.5	14.8	−0.103 75	−0.005 24	KF391802
31			<i>A. inscripta</i>	644.0	38.8	14.9	31.7	14.6	−0.101 32	−0.010 53	KF390277	
32			<i>Garrha ocellifera</i>	644.0	37.7	16.0	31.7	14.6	−0.087 25	−0.045 69	KF809179	
33			<i>G. costimacula</i>	644.0	38.5	15.5	30.9	15.1	−0.109 62	−0.015 23	KF405524	
34			<i>Stathmopodinae</i> sp.	644.0	40.5	16.1	28.6	14.8	−0.173 03	−0.045 23	HM376368	
35			<i>Atrijuglans hetaohei</i>	644.0	39.4	16.0	29.5	15.1	−0.144 14	−0.030 00	KP202832	
	平均值			644.0	39.8	15.1	30.5	14.7	−0.132 03	−0.011 87		

表 3 核桃举肢蛾及其他 21 种昆虫 Cytb 基因序列的碱基组成特点											
Table 3 Base composition characteristics of Cytb gene sequences from <i>A. hetaohei</i> and 21 other insect species											
编号	物种名称及分类阶元			序列 长度/bp	碱基含量/%				AT 偏倚度	GC 偏倚度	GenBank 登录号
					T	C	A	G			
1	凤蝶总科	凤蝶科	<i>Parnassius bremeri</i>	479	44.9	14.4	30.1	10.6	−0.197 8	−0.150 0	HM243588
2			<i>P. bremeri</i>	479	43.6	14.6	31.5	10.2	−0.161 1	−0.176 5	FJ871125
3			<i>P. apollo</i>	479	43.6	15.2	30.7	10.4	−0.174 2	−0.187 0	KF746065
4		蛱蝶科	<i>Heliconius hecale</i>	479	43.0	14.2	32.4	10.4	−0.141 3	−0.152 5	KM068091
5			<i>H. pacheus</i>	479	43.2	14.8	31.7	10.2	−0.153 2	−0.183 3	KM014809
6			<i>H. melpomene</i>	479	44.1	13.8	31.9	10.2	−0.159 3	−0.147 8	HE579083
7			<i>Issoria lathonia</i>	479	43.0	15.2	31.7	10.0	−0.150 8	−0.206 6	HM243590
8			<i>Arqynnis hyperbicus</i>	479	43.2	15.7	30.9	10.2	−0.166 2	−0.209 7	JF439070
9			<i>A. childreni</i>	479	43.0	15.9	30.9	10.2	−0.163 8	−0.216 0	KF590547
10	蚕蛾总科	天蚕科	<i>Sphinx morio</i>	479	42.2	14.8	33.0	10.0	−0.122 2	−0.193 3	KC470083
11			家蚕蛾科	<i>Rondotia menciana</i>	479	43.0	14.0	31.9	11.1	−0.147 6	−0.116 7
12		螟蛾总科		草螟科	<i>Ostrinia orientalis</i>	479	39.9	15.0	35.1	10.0	−0.064 1

续表 3

编号	物种名称及分类阶元		序列 长度/bp	碱基含量/%				AT 偏倚度	GC 偏倚度	GenBank 登录号
				T	C	A	G			
13		<i>O. scapularis</i>	479	39.7	15.2	35.3	9.8	−0.058 5	−0.216 7	FJ435429
14		<i>O. narynensis</i>	479	39.9	15.0	35.3	9.8	−0.061 1	−0.210 1	FJ435430
15		<i>O. nubilalis</i>	479	39.9	15.0	35.3	9.8	−0.061 1	−0.210 1	AF442957
16		<i>O. furnacalis</i>	479	39.7	15.4	34.7	10.2	−0.067 4	−0.203 3	FJ435424
17		<i>O. furnacalis</i>	479	39.7	15.7	34.7	10.0	−0.067 4	−0.219 5	FJ435425
18		<i>O. furnacalis</i>	479	39.7	15.4	34.7	10.2	−0.067 4	−0.203 3	EU418259
19		<i>O. furnacalis</i>	479	39.7	15.4	34.7	10.2	−0.067 4	−0.203 3	EU418260
20		<i>O. furnacalis</i>	479	39.7	15.4	34.7	10.2	−0.067 4	−0.203 3	EU418262
21		<i>O. furnacalis</i>	479	39.9	15.2	34.7	10.2	−0.070 0	−0.196 7	AF467260
22	夜蛾总科 灰夜蛾科	<i>Spodoptera littoralis</i>	479	40.7	15.0	33.0	11.3	−0.104 8	−0.142 9	HQ177686
23		<i>S. littoralis</i>	479	40.9	14.8	33.4	10.9	−0.101 1	−0.154 5	HQ177685
24		<i>S. dolichos</i>	479	40.7	15.7	33.0	10.6	−0.104 8	−0.190 5	HQ177640
25		<i>S. dolichos</i>	479	41.1	15.2	33.0	10.6	−0.109 9	−0.177 4	HQ177643
26		<i>S. dolichos</i>	479	41.1	15.2	33.0	10.6	−0.109 9	−0.177 4	HQ177647
27		<i>S. praefica</i>	479	42.0	14.4	32.4	11.3	−0.129 2	−0.122 0	HQ177719
28		<i>S. mauritia</i>	479	42.6	14.6	31.9	10.9	−0.142 9	−0.147 5	HQ177702
29		<i>S. marima</i>	479	42.4	14.4	32.4	10.9	−0.134 1	−0.140 5	HQ177698
30		<i>S. marima</i>	479	42.4	14.4	32.4	10.9	−0.134 1	−0.140 5	HQ177699
31		<i>S. frugiperda</i>	479	43.6	13.8	31.5	11.1	−0.161 1	−0.109 2	HQ177673
32	麦蛾总科 草蛾科	<i>Ethmia epupostica</i>	479	41.3	17.1	31.1	10.4	−0.141 2	−0.242 4	KJ508047
33		织蛾科 <i>Atrijuglans hetaohei</i>	479	41.5	14.8	33.4	10.2	−0.108 6	−0.183 3	KP202833
		平均值	479	41.7	15.0	32.9	10.4	−0.117 3	−0.179 8	

表 4 基于 CO I 基因序列的碱基替换模式

Table 4 Base substitution mode of CO I gene sequences

位点	碱基转换	碱基颠换	R 值	碱基替换频次									
				TT	TC	TA	TG	CC	CA	CG	AA	AG	GG
第 1 位点	10	3	3.84	55	2	2	1	26	0	0	65	2	56
第 2 位点	2	1	1.75	91	1	0	0	54	0	0	33	1	35
第 3 位点	14	40	0.36	79	12	35	1	3	4	0	77	2	0
总计	26	44	0.60	225	21	37	2	83	4	0	175	5	91

表 5 基因 CO I 基因序列的特殊位点分布

Table 5 Distribution of specific sites in CO I gene sequences

位点	保守位点	变异性位点	变异率/%	简约信息位点	单突变位点
第 1 位点	167	48	22.33	42	7
第 2 位点	203	12	5.58	8	3
第 3 位点	35	179	83.64	148	31
总计	405	239	37.11	198	41

2.3.2 基于 Cytb 基因序列的遗传多样性和碱基替换分析 利用 MEGA 5.0 软件分析核桃举肢蛾及其他 21 种鳞翅目昆虫 Cytb 基因的总体平均遗传距离为 11.02%。其中,核桃举肢蛾与凤蝶总科 *Parnassius bremeri* 遗传距离最小,为 10.8%;与麦蛾总科的 *Ethmia epupostica* 遗传距离最大,为 14.5%。种间遗传距离最小为 0.2%,发生在螟蛾总科 *Ostrinia scapularis*、*O. orientalis*、*O. nubilalis* 和 *O. narynensis* 之间;*Spodoptera littoralis* 与 *Ethmia epupostica* 的种间遗传距离最大,为 17.6%。

在核桃举肢蛾及其他 21 种昆虫的 Cytb 基因序

列的碱基替换模式中,颠换明显高于转换,*R* 值为 0.59,如表 6 所示。碱基颠换主要发生在 T-A 之间,占颠换总数的 86.21%,C-A 间转换占总颠换数的 9.5%,不包含 T-G 和 C-G 颠换;转换主要发生在 T-C 之间,占转换总数的 81.82%,而 A-G 之间转换占转换总数的 18.18%。

对包括核桃举肢蛾在内的 22 种昆虫的 Cytb 基因的特殊位点分布分析,共检测到变异位点 181 个,变异率为 37.78%,其中简约信息位点 138 个,单突变位点 43 个(表 7)。密码子第 2 位碱基保守性最强,其次为第 1 位点,密码子第 3 位的变异性最强,

变异率为 26.51%。

从基于核桃举肢蛾及其他 21 种昆虫的 Cytb 基因序列建立的碱基替换饱和度分析趋势图(图 2)看,Cytb 基因序列的碱基转换数和颠换数随种间遗传距离的增大呈明显上升趋势。

2.4 基于 CO I 和 Cytb 基因序列的系统进化分析

利用 NJ 法分别构建核桃展蛾及其对应鳞翅目昆虫基于 CO I 和 Cytb 基因序列的分子进化树,如图 3 所示,基于两段序列构建的分子系统进化树均分为 4 个明显分支。其中,基于 CO I 基因序列构建的进化树中,夜蛾总科、巢蛾总科、蚕蛾总科以及凤蝶总科和螟蛾总科分别单独形成 1 个分支,核桃举肢蛾与麦蛾总科的草潜蛾科的 *Stephensia brun-nichella* 亲缘关系最近;以 Cytb 基因序列构建的分子系统进化树中,蚕蛾总科、凤蝶总科和夜蛾总科的

表 6 基于 Cytb 基因序列的碱基替换模式

位点	碱基转换	碱基颠换	R 值	碱基替换频次									
				TT	TC	TA	TG	CC	CA	CG	AA	AG	GG
第 1 位点	6	4	1.34	50	4	4	1	24	0	0	47	2	56
第 2 位点	2	1	1.66	68	2	1	0	35	1	0	34	1	35
第 3 位点	14	23	0.6	59	12	20	0	2	3	0	61	2	0
总计	22	29	0.77	178	18	25	1	61	4	1	141	4	92

表 7 基因 Cytb 基因序列的特殊位点分布

位点	保守位点	变异性位点	变异率/%	简约信息位点	单突变位点
第 1 位点	121	39	8.14	10	10
第 2 位点	145	15	3.13	29	5
第 3 位点	32	127	26.51	99	28
总计	298	181	37.78	138	43

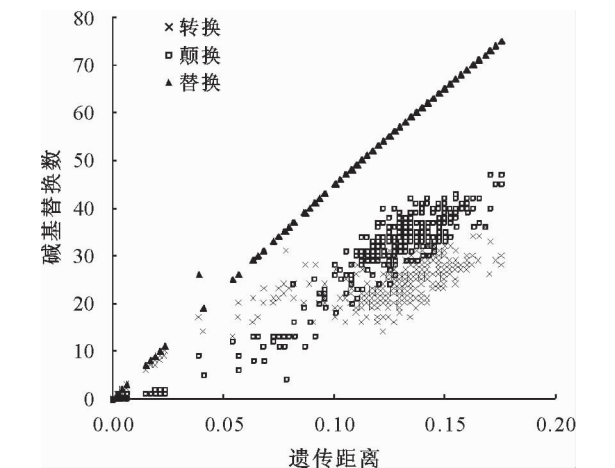


图 2 核桃举肢蛾及其他 21 种昆虫的 Cytb 基因序列的碱基替换饱和度分析

Fig. 2 Saturation analysis of base substitution of Cytb gene sequences from *A. hetaohei* and 21 other insect species

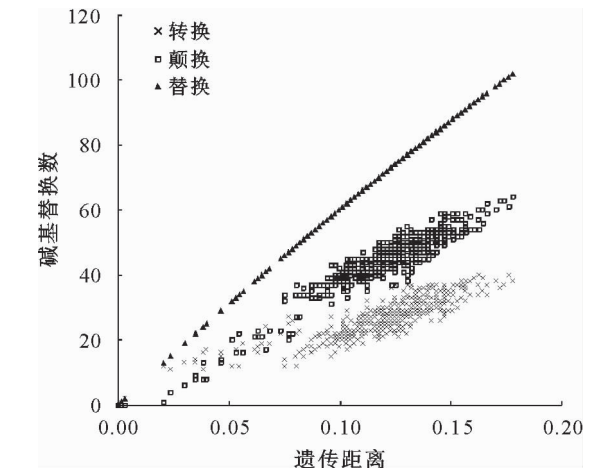


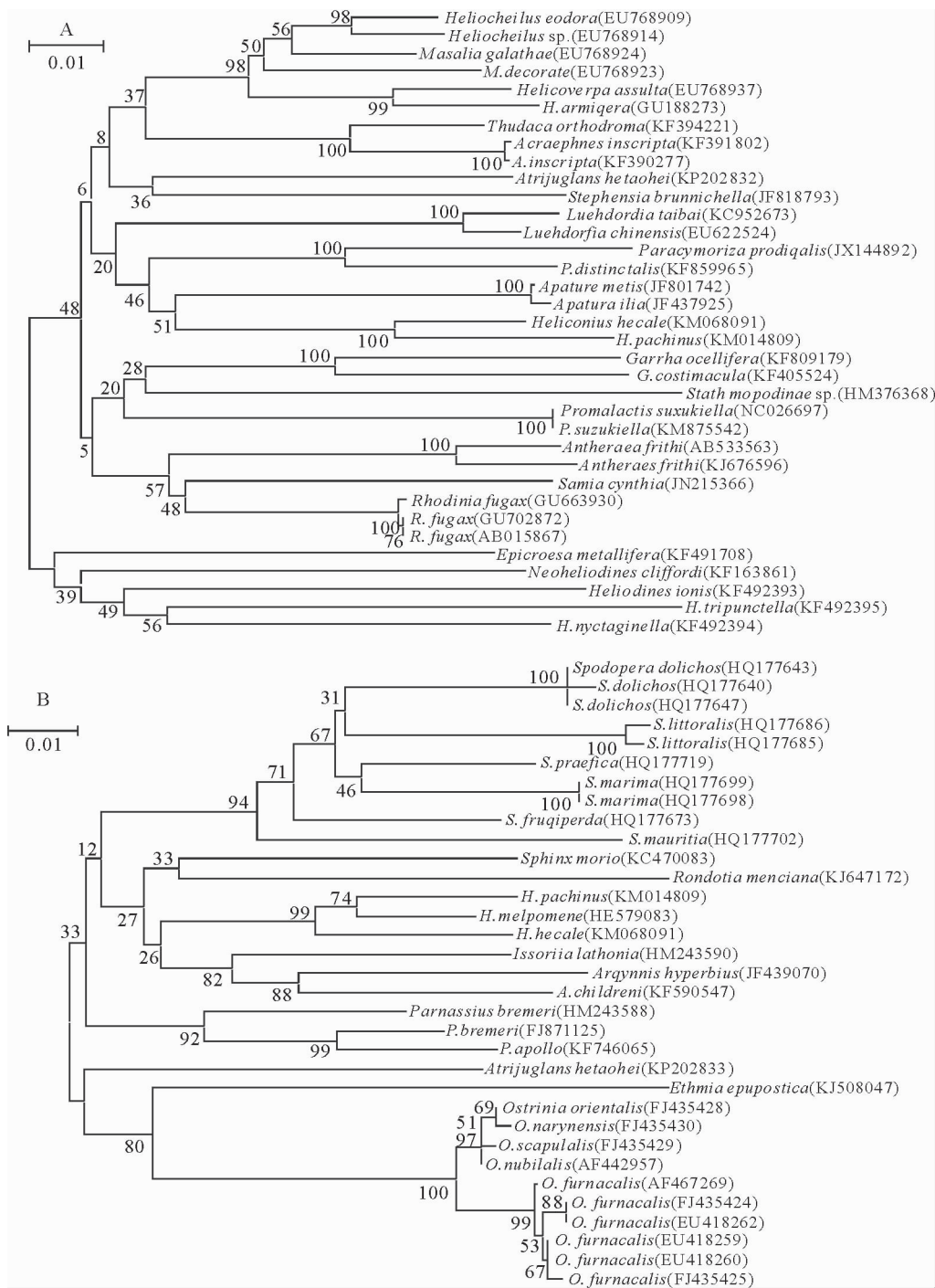
图 1 核桃举肢蛾及其他 29 种昆虫的 CO I 基因序列的碱基替换饱和度分析

Fig. 1 Saturation analysis of base substitution of CO I gene sequences from *A. hetaohei* and 29 other insect species

所有昆虫分别单独形成 1 个分支,核桃举肢蛾与麦蛾总科草蛾科的 *Ethmia epupostica* 亲缘关系最近。

3 结论与讨论

相对于 AFLP、ISSR 或 RAPD 等序列分析方法,在遗传多样性和系统进化分析中,DNA 序列分析的结果更直接、准确和可靠^[19-20]。线粒体基因具有进化速率快,呈母系遗传等特点,目前,诸如线粒体 CO I、CO II、Cytb 等基因甚至线粒体全基因已被广泛用于研究昆虫的遗传多样性和系统进化分析。本研究利用扩增获得的核桃举肢蛾 CO I 和 Cytb 基因片段及其他相关鳞翅目昆虫相应基因片段,分别进行独立分析并采用 NJ 法构建系统发育树,其中,凤蝶总科、巢蛾总科、夜蛾总科和蚕蛾总科的所有昆虫各自形成独立分支,核桃举肢蛾与麦蛾总科昆虫处于同一个分支下,表明核桃举肢蛾的分子分类鉴



注: A. 基于 CO I 基因序列的分子进化树; B. 基于 Cytb 基因序列的分子进化树。

图 3 核桃举肢蛾及鳞翅目其他昆虫基于 CO I 和 Cytb 基因序列的分子进化关系

定结果与最新的传统形态学分类结果是一致的,为核桃举肢蛾的分子分类鉴定提供了理论依据。

运用 CO I 和 Cytb 基因片段对包括核桃举肢蛾在内的相关鳞翅目昆虫同源序列碱基组成分析表明,在鳞翅目昆虫相关基因序列的碱基组成特点分析中,CO I 和 Cytb 基因都表现为 A+T 含量明显高于 G+C 含量,碱基使用明显偏向于 T,且密码子第 2 位点保守性最强,第 3 位点变异率最高。这与对鳞翅目其他昆虫的研究结果是完全一致的^[21-23]。

同时,每个氨基酸密码子不同位点的碱基组成差异也很大,其中第 3 位点 A+T 平均含量最高(CO I, 93.8%; Cytb, 93%),而碱基 G 的平均含量仅为 0.8%和 1%,这表明密码子的使用频率存在明显的偏向性。

碱基的替换模式分析表明,颠换主要发生在 T-A 之间(CO I, 84.09%; Cytb, 86.21%),转换主要发生在 T-C 之间(CO I, 80.77%; Cytb, 81.82%),且颠换明显高于转换,这与同源序列的分析结果是

一致的。

从 2 段序列的碱基替换饱和度分析图中可以看出,碱基的转换和颠换与遗传距离之间存在良好的线性关系。基于 CO I 和 Cytb 基因片段的饱和度分析图中发现,当遗传距离较小时,转换大于颠换,随遗传距离增加到 0.08 以上时,颠换则超过了转换,而总体趋势是一致的。

虽然分子系统树的拓扑结构总体一致,但也存在一些差异:CO I 基因构建的进化树中,螟蛾总科的 *Paracymoriza prodigalis* 和 *P. distinctalis* 与凤蛾总科的昆虫处于同一个分支下;在 Cytb 基因构建的进化树中,螟蛾总科的 *O. nubilalis* 和 *O. furnacalis* 与麦蛾总科的昆虫处于同一分支下。分析原因可能为本研究所使用的 CO I 和 Cytb 基因序列片段所覆盖的信息还不够充足,通过获得更多相关昆虫的基因序列信息,可使分析结果更加准确。

参考文献:

[1] 金骥,卢友三. 核桃黑(虫害)初步观察及防治研讨[J]. 农业科学通讯,1954(8):440-441.

[2] 李后魂. 秦岭小蛾类、昆虫纲:鳞翅目[M]. 北京:科学出版社,2012:64-70.

[3] 王兴旺,李峰,李强,等. 核桃举肢蛾生物学特性的研究[J]. 四川林业科技,2007,28(1):81-83.

[4] 光志琼. 洛南县核桃举肢蛾发生规律及防治研究[J]. 中国园艺文摘,2011(1):76-78.

GUANG Z Q. The occurrence regularity and control measures of *Atrijuglans hetaohei* in Luonan County[J]. Chinese Horticulture Abstracts,2011(1):76-78. (in Chinese)

[5] 宋继学,李东鸿. 核桃举肢蛾发生规律和防治研究[J]. 西北林学院学报,1990,5(1):39-45.

SONG J X, LI D H. Studies on the bionomics and integrated control of *Atrijuglans hetaohei* Yang[J]. Journal of Northwest Forestry University,1990,5(1):39-45. (in Chinese)

[6] 满红. 生物防治核桃举肢蛾措施[J]. 山西果树,2012(1):46.

[7] 田敏爵,刘凤利,董军强. 商洛地区核桃举肢蛾的生活史及防治[J]. 西北林学院学报,2010,25(2):127-129.

TIAN M J, LIU F L, DONG J Q. Out breaking regularity of *Atrijuglans hetaohei* and its comprehensive control techniques [J]. Journal of Northwest Forestry University,2010,25(2):127-129. (in Chinese)

[8] 郝兴宇,张金桐,王瑞,等. 核桃举肢蛾性信息素腺体提取物的成分分析[J]. 山西农业大学学报:自然科学版,2007,27(4):409-411.

HAO X Y, ZHANG J T, WANG R, *et al.* Component analysis of the sex pheromone gland secretion for *Atrijuglans hetaohei* Yang[J]. J. Shanxi Agric. Univ. : Natural Science Edition, 2002,27(4):409-411. (in Chinese)

[9] 成跃新,周红章,张广学. 分子生物学技术在昆虫系统学研究中的应用[J]. 动物分类学报,2000,25(2):121-133.

CHENG Y X, ZHOU H Z, ZHANG G X. Perspective of molecular biological techniques applien in insect systemitics[J]. Acta Zootaxonomica Sinica,2000,25(2):121-133. (in Chinese)

[10] CLARY D O, WOLSTENHOLME D R. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code[J]. J. Mol. Evol. ,1985,22(3):252-271.

[11] BOORE J L. Animal mitochondrial genomes[J]. Nucleic Acids Res. ,1999,27(8):1767-1780.

[12] 任竹梅,马恩波,郭亚平. 山稻蝗及相关物种 Cytb 基因序列及其遗传关系[J]. 遗传学报,2002(6):507-513.

REN Z M, MA E B, GUO Y P. Genetic relationships among *Oryza agavisa* and other relative species revealed by Cytb Sequences[J]. Acta Genetica Sinica,2002(6):507-513. (in Chinese)

[13] 戴金霞. 线粒体 Cytb 基因与昆虫分子系统学研究[J]. 四川动物,2005(2):222-225.

[14] 刘慎思,张桂芬,万方浩. 基于 mtDNA CO I 基因的离腹寡毛实蝇属常见种 DNA 条形码识别和系统发育分析[J]. 昆虫学报,2014,57(3):343-355.

LIU S S, ZHANG G F, WAN F H. DNA barcoding and phylogenetic analysis of common species of the genus *Bactrocera* (Diptera: Tephritidae) based on mtDNA CO I gene sequences [J]. Acta Entomologica Sinica,2014,57(3):343-355. (in Chinese)

[15] 李小凤,田虎,张金良,等. 基于 CO I 基因 5 端与 3 端序列田间常见粉虱的分子鉴定[J]. 昆虫学报,2014,57(4):466-476.

LI X F, TIAN H, ZHANG J L, *et al.* Identification of common whitefly species (Hemiptera: Aleyrodidae) in China based on the 5'-and 3'-end sequences of the CO I gene[J]. Acta Entomologica Sinica,2014,57(4):466-476. (in Chinese)

[16] 毛增辉,郝家胜,朱国萍,等. 菜粉蝶线粒体基因组的全序列测定和分析[J]. 昆虫学报,2010,53(11):1295-1304.

MAO Z H, HAO J S, ZHU G P, *et al.* Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of *Pieris rapae* Linnaeus (Lepidoptera: Pieridae) [J]. Acta Entomologica Sinica, 2010,53(11):1295-1304. (in Chinese)

[17] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAC F, *et al.* The clustal-windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research,1997,25:4876-4882.

[18] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, *et al.* MEGA 4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Molecular Biology and Evolution,2007,24:1596-1599.

[19] SMMONS M P, ZHANG L B, WEBB C T, *et al.* A penalty of using anonymous dominant markers (AFLPs, ISSRs, and RAPDs) for phylogenetic inference[J]. Mol. Phylogenetics Evolution,2007,42:528-542.

[20] SCHWARZBACH A E, RICKLEFS R E. The use of molecular data in mangrove plant research[J]. Wetlands Ecology, Manage,2001,9:195-201.

[21] 张大秀,郝家胜,邹方振,等. 基于线粒体 Cytb 基因和 CO I 基因序列研究豹蛱蝶亚科(鳞翅目,蛱蝶科)10 属间的系统发生关系[J]. 动物分类学报,2009,34(3):522-530.

[22] 李玮玮,张修月,陈伟才,等. 小蔗螟 Cytb 基因序列的分析研究(鳞翅目:螟蛾总科:草螟亚科)[J]. 四川动物,2009,34(3):353-357.

[23] 倪艳,诸立新,王忠锁. 基于 CO I、CO II 和 Cytb 基因部分序列研究斑粉蝶属(鳞翅目,粉蝶科)分子系统关系[J]. 动物分类学报,2010,35(3):504-517.